

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

**Contribution à l'étude de la localisation subcellulaire d'Hyal-1 dans les cellules HepG2:
mise au point d'une méthode d'allègement des lysosomes par la progestérone**

Costa, Chrisostome

Award date:
2006

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**Contribution à l'étude de la localisation subcellulaire d'Hyal-1 dans les cellules HepG2
Mise au point d'une méthode d'allègement des lysosomes par la progestérone**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Licencié en Sciences biologiques**

Chrisostome COSTA

Juin 2006

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Contribution à l'étude de la localisation subcellulaire d'Hyal-1 dans les cellules HepG2

Mise au point d'une méthode d'allègement des lysosomes par la progestérone

COSTA Chrisostome

Résumé

Hyal-1, une enzyme de la famille des hyaluronidases, est considérée dans la littérature comme une enzyme lysosomale. Cependant, il n'existe aucune preuve expérimentale à ce propos. Des études de la localisation d'Hyal-1 ont donc été menées dans notre laboratoire et les résultats obtenus sur le foie de rat et le foie de souris sont en défaveur d'une localisation dans les lysosomes. L'objet de notre mémoire était de nous poser la même question à propos de cellules en culture, un système expérimental permettant d'éviter toute contamination par la très abondante Hyal-1 du plasma. Nous avons choisi les cellules humaines d'hépatocarcinome (HepG2), car elles sont considérées comme étant les plus riches en messager d'Hyal-1. Dans un premier temps, nous avons mis au point une technique d'allègement sélectif des lysosomes afin de pouvoir distinguer sans ambiguïté ces organites des autres compartiments subcellulaires. Nous avons pour ce faire recouru à la progestérone. Cette dernière est en effet décrite dans la littérature comme un agent induisant l'accumulation du cholestérol dans les lysosomes en bloquant la fonction de la protéine NPC1. Nous avons comparé la distribution de différents marqueurs enzymatiques de cellules témoins et de cellules tests (cellules mises en présence de la progestérone pendant 12, 24 et 48h) après centrifugation différentielle d'un homogénat et après centrifugation isopycnique d'une fraction post nucléaire sédimentable. Nous avons observé que les lysosomes modifiés sous l'effet de la progestérone voient leur densité progressivement diminuée au cours du temps. Ce déplacement de densité nous a permis de distinguer clairement les lysosomes des autres organites subcellulaires. Nous avons ensuite comparé, dans les cellules traitées par la progestérone, la distribution intracellulaire d'une enzyme de lysosome avec celle d'Hyal-1 et nous avons pu constater que les distributions intracellulaires de ces deux enzymes sont clairement différentes, excluant la localisation d'Hyal-1 dans les lysosomes.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2006

Promoteur: Michel Jadot

Copromoteur: Jacqueline Thirion

Merci à vous tous (toutes) !

- Madame Jacqueline Thirion : j'ai beaucoup apprécié votre méthode de travail. Vous m'avez permis de prendre vite conscience que je pouvais mener à bien mon mémoire. Vous m'avez permis de comprendre vite que je pouvais seul organiser et réaliser toutes les manipulations. Vous savez discuter avec les gens, ce qui m'a également permis de bien m'investir. Je vous remercie également pour toutes les manipulations que nous avons faites à deux.
- Madame Jeannine Mertens-Strijthagen : vous étiez attentive aux manipulations que je faisais, aide qui m'a permis de voir mes erreurs et de les corriger. Je vous remercie également pour toutes les fois que je ne pouvais pas faire tout seul un western et que vous m'y avez aidé (tenir une membrane, m'accompagner pour la révélation, stripper les membranes,...). Je vous remercie pour tous vos conseils.
- Monsieur Michel Jadot: chaque réunion avec vous m'a permis de comprendre d'avantage l'orientation que le travail de mon mémoire devait prendre. Je vous en remercie.
- Marie Christine : vous m'avez guidé à réaliser les Western-blottings. Je vous remercie également pour les données de vos expériences sur Hya-1 que vous m'avez transmises.
- Madame Arlette Dautreloux : vous avez mis à ma disposition les différentes techniques de dosages et les solutions à utiliser. Chaque fois que j'avais des doutes au cours de mes manipulations, je m'adressais à vous. Je vous remercie de m'avoir aidé à préparer des gradients.
- Monsieur Michel Savek : je vous remercie d'avoir toujours trouvé une solution lorsqu'il arrivait que les programmes informatiques que j'utilisais se "plantaient".
- Madame et Monsieur Wattiaux-De Coninck : merci pour vos conseils et précisions en ce qui concerne les images de MET.

Merci à toute l'équipe d'Unité de Recherche en Physiologie Moléculaire aux FUNDP (Département de chimie physiologique, Laboratoire de physiologie et pharmacologie, et

Laboratoire de Neurobiologie) qui m'a soutenu d'une manière ou d'une autre (geste, salutation, brin de causerie, aide technique, conseil, etc...). Toutes ces attentions m'ont permis de pouvoir m'intégrer dans le groupe et de mener à bien le travail de mon mémoire.

Je remercie également le département d'Histologie et d'Embryologie, Service de Microscopie Electronique. Je remercie particulièrement Madame Marie-France Six et Monsieur Yves Houbion qui m'ont aidé, respectivement, à la préparation des coupes et des grilles, et à l'utilisation du microscope électronique à transmission. Je remercie également Madame Michèle Smekens pour ses conseils et ses précisions par rapport aux images de MET, ainsi que pour les manuels qu'elle m'a prêtés.

Abréviations

ADNc	Acide desoxyribonucléique complémentaire
ARNm	acide ribonucléique messager
ASR	activité spécifique relative
CD44	Clusters of differentiation 44
Da	Dalton
EDTA	Acide éthylènediamine-tétra-acétique
GAG	glycosaminoglycane
GlcUA	acide D- glucuronique
GlcNAc	N-acétyl-D-glucosamine
GPI	glycophosphatidylinositol
HA	hyaluronan
HAS	hyaluronan synthase
HRP	Horse Raddish Peroxydase=peroxydase de raifort
HS	Héparan Sulfate
Hyal	hyaluronidases
Lamp-1	Lysosomal-Associated Membrane Protein1
LUCA-1	Lung Cancer- 1
MEC	matrice extra-cellulaire
NPC	Niemann-Pick type C
PBS	Phospate Buffer Saline
PHYAL-1	pseudo-HYAL- 1
RHAMM	receptor for hyaluronate-mediated motility
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SPAM-1	Sperm Adhesion Molecule- 1
TEMED	NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine
TNF	Tumor necrosis factor
TSG	Tumor suppressor gene=gene suppresseur de tumeur

TABLE DE MATIERES

I)	INTRODUCTION.....
1)	L'HYALURONAN ET LES HYALURONIDASES.....
1.1)	Découverte et structure chimique de l'hyaluronan.....
1.2)	Propriétés physico-chimiques et biologiques de l'hyaluronan.....
1.3)	Synthèse de l'hyaluronan.....
1.4)	Interactions de l'hyaluronan avec la surface cellulaire.....
1.5)	Localisation et rôles de l'hyaluronan.....
1.6)	L'hyaluronan et cancer.....
1.7)	Métabolisme de l'hyaluronan.....
1.7)1.	Les hyaluronidases.....
	A. Historique et classification des hyaluronidases.....
	B. Hyaluronidases et gènes HYAL.....
	C. Localisation et activité enzymatique des hyaluronidases.....
	D. Hyal-1.....
	E. Autres enzymes de la famille Hyal.....
2)	MODIFICATION SELECTIVE DE LA DENSITE DES LYSOSOMES.....
2.1)	surcharge des lysosomes en cholestérol.....
	A. Transport du cholestérol hors des lysosomes.....
	B. La protéine Niemann-Pick type C1 (NPC1).....
	C. La protéine Niemann-Pick type C2 (NPC2).....
	D. La progestérone comme agent bloquant le transport du cholestérol hors des lysosomes.....
	E. Transport postlysosomal de cholestérol dans les cellules Niemann-Pick type C.....

- F. Transport postlysosomal de cholestérol dans les mutants NPC1 fibroblastiques humains.....
- G. Transport postlysosomal de cholestérol chez les souris NPC1-/-.....
- H. Transport postlysosomal de cholestérol chez les souris BALB/c.....

3) **BUT ET DEMARCHE DU TRAVAIL.....**

- 3.1) But.....
- 3.2) Démarche expérimentale.....
 - A. Mise au point d'une méthode d'allègement des lysosomes des cellules HepG2.....
 - B. Localisation subcellulaire d'Hyal-1.....

II) MATÉRIELS ET MÉTHODES

- 1) Culture cellulaire.....
- 2) Préparation d'homogénats cellulaires.....
- 3) Fractionnement complet par centrifugation différentielle.....
- 4) Centrifugation isopycnique en gradient continu de saccharose.....
- 5) Les enzymes de référence.....
- 6) Western-Blotting.....
- 7) Microscopie électronique à transmission.....
- 8) Présentation des résultats.....
 - A. Dosages enzymatiques des fractions issues du fractionnement complet par centrifugation différentielle.....
 - B. Dosages enzymatiques des fractions issues d'un gradient continu en saccharose.....
 - C. Western Blotting.....

III)	Résultats et discussion.....
IV)	Effet de la progestérone (10µg/ml) sur..... les cellules HepG2
	A. Etude morphologique : Microscopie électronique..... à transmission (MET)
	B. Distribution des enzymes de référence après..... centrifugation fractionnée de l'homogénat
	C. Distribution des marqueurs enzymatiques après..... centrifugation isopycnique en gradient de saccharose des fractions post nucléaires sédiementables (MLP)
	D. Examen morphologique.....
2)	Localisation intracellulaire de l'hyaluronidase-1.....
	A. Distributione de l'hyaluronidase-1 après..... centrifugation fractionnée de l'homogénat
	B. Distribution d'hyaluronidase-1 après..... centrifugation isopycnique en gradient de saccharose des fractions post nucléaires sédimentables (MLP)
V)	Conclusions et perspectives.....
VI)	Bibliographie.....

I) INTRODUCTION

1) L'HYALURONAN ET LES HYALURONIDASES

1.1) Découverte et structure chimique de l'hyaluronan

L'hyaluronan (HA) a été découvert dans l'humeur vitrée de l'œil de bovin par Meyer et Palmer en 1934.

Cette molécule est composée d'une unité répétitive de disaccharides, acide D-glucuronique lié par une liaison β -(1,3) au N-acétyl-D-glucosamine, liés par des liaisons β -(1,4). Le polymère d'HA est non branché, chargé négativement et est le seul GAG à être non sulfaté (Scott et Heatley, 1999 ; Heldin, 2003 ; Stern, 2003).

1.2) Propriétés physico-chimiques et biologiques de l'hyaluronan

Longue de 2 à 25 micromètres, la molécule d'hyaluronan est formée d'une répétition de 2000 à 2500 unités de disaccharides ; sa masse moléculaire relative est comprise entre 10^5 et 10^7 kDa (Toole, 2004 ; Stern, 2003).

L'HA a la propriété de s'associer avec lui-même ou de se complexer avec d'autres molécules telles que les protéoglycans, les phospholipides et d'autres molécules de la matrice extracellulaire (Toole, 2004).

L'HA est visqueux et détermine la résilience, ainsi que la malléabilité des tissus. Au pH physiologique, des groupements carboxyliques de l'acide glucuronique peuvent être ionisés, ce qui permet la fixation de certains cations (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++}).

1.3) Synthèse de l'hyaluronan

La synthèse de HA n'a pas lieu dans le réticulum endoplasmique rugueux et le Golgi, comme c'est le cas pour tous les autres GAGs, mais prend place plutôt dans un complexe situé sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique. L'HA est synthétisé par des enzymes transmembranaires, les hyaluronan-synthases (HAS : HAS1, HAS2, HAS3) ; il est expulsé dans la matrice extracellulaire au fur et à mesure de sa synthèse sur la face cytoplasmique de la membrane (Toole, 2004).

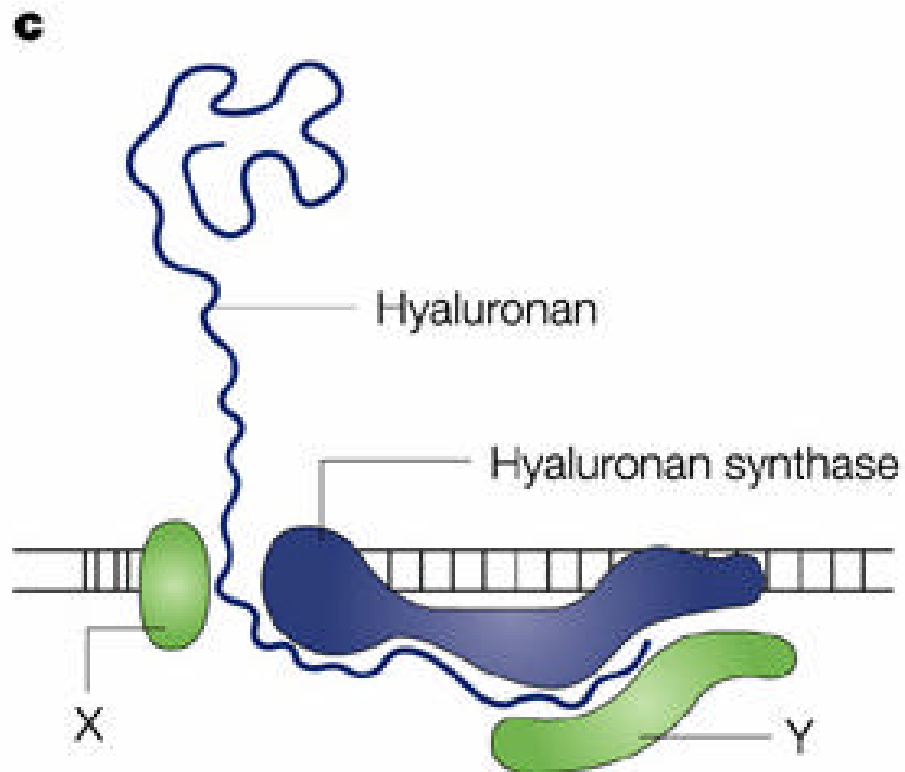


Fig. 1. L'hyaluronan synthase prend place à la face cytoplasmique de la membrane plasmique et l'hyaluronan en cours de synthèse est extrait de la membrane plasmique pendant qu'il reste attaché aux synthases qui le produisent. X et Y sont des protéines régulatrices.

1.4) Interactions de l'hyaluronan avec la surface cellulaire

L'HA emprunte, au moins, deux voies pour interagir avec les surfaces cellulaires. D'une part, il peut se lier à ses récepteurs. Ceux-ci sont des protéines appelées hyaladhérines et les plus importants déjà identifiés sont les récepteurs CD44 et RHAMM (Turley et Harrison, 1999). CD44 et RHAMM sont des récepteurs induisant un signal de transduction qui influence la prolifération cellulaire, la survie et la motilité, et sont connus pour être impliqués dans le cancer. CD44 est considéré comme le récepteur prédominant de l'HA (Knudson, 1999, Formby et Stern, 2003 ; Toole, 2004). D'autre part, l'HA peut se lier directement avec ses HAS (Fig. 1), ce qui génère une volumineuse matrice (manteau) péricellulaire, mais le signal qui pourrait être induit à partir des HAS n'est pas encore établi (Toole, 2004).

1.5) Localisation et rôles de l'hyaluronan

La peau renferme la plus grande quantité de HA (7-8g), ce qui correspond à la moitié de la quantité totale de HA (15g) pour un adulte de taille moyenne pesant 70 kg. L'HA est réparti dans l'épiderme (2-4mg/ml) et dans le derme (~ 0,5mg/ml) avec une très grande quantité de HA (~ 4mg/ml) concentré dans la matrice entourant les kératinocytes.

Le cordon ombilical, quant à lui, est considéré comme le tissu ayant la plus grande quantité de HA chez les mammifères (Hascall, 1997 ; Stern, 2003).

L'humeur vitrée de l'œil contient aussi une quantité appréciable de HA (2mg/ml). Le polymère HA y forme un réseau solide et stable, ce qui est d'une importance capitale pour la vue, car une telle structure permet à la lumière de passer entre les mailles du polymère.

La matrice extracellulaire du parenchyme pulmonaire et les sécrétions des bronches sont composées majoritairement de HA, mais l'HA est aussi présent dans le fluide séminal, ainsi que dans la muqueuse nasale. Ses propriétés viscoélastiques permettent l'hydratation des muqueuses, le transport du mucus en dehors des bronches et la réparation de l'épithélium (Forteza et al. 2002).

L'HA est synthétisé dans les articulations participant ainsi à la viscoélasticité du fluide synovial (Hascall, 1997).

La lymphe contient en moyenne 40µg/ml de HA. Une élévation de la concentration de cette molécule dans la lymphe (~ 250µg/ml) est un indicateur dans des maladies, comme l'arthrite rhumatoïde, le cancer et les maladies inflammatoires et vasculaires (Heldin, 2003).

Toutes les artères et les veines contiennent une quantité de HA dépendant de l'âge du vaisseau. Ainsi, en conditions physiologiques normales, l'artère du cordon ombilical du fœtus humain contient environ 40% de la quantité totale de HA et pour un adulte, les artères ne contiennent que 4 à 6 % de HA total (Wight, 1999).

Un rein normal contient environ 400µg/g de matière sèche dans la papille, 250µg/g dans la médullaire externe et seulement moins de 5µg/g dans le cortex. Les maladies rénales s'accompagnent d'une accumulation de HA, spécialement dans le cortex (Göranson et al. 2001).

La quantité de HA n'est pas homogène partout dans les intestins : le duodénum comprend quatre fois moins de HA que le colon (Göranson et al. 2001).

L'HA peut entrer dans les cellules (Collis et al. 1998) grâce à ses récepteurs, comme le CD44 (Culty et al. 1992 ; Hua et al. 1993 ; Kaya et al. 1997) et RHAMM (Cheung et al. 1999) pour se localiser dans le cytoplasme, dans le noyau et dans le nucléole (Evanko et al. 1999 ; Tammi et al. 2001).

L'HA est très présent dans les glycocalyx, dans la surface apicale des cellules endothéliales (Henry et al. 1999).

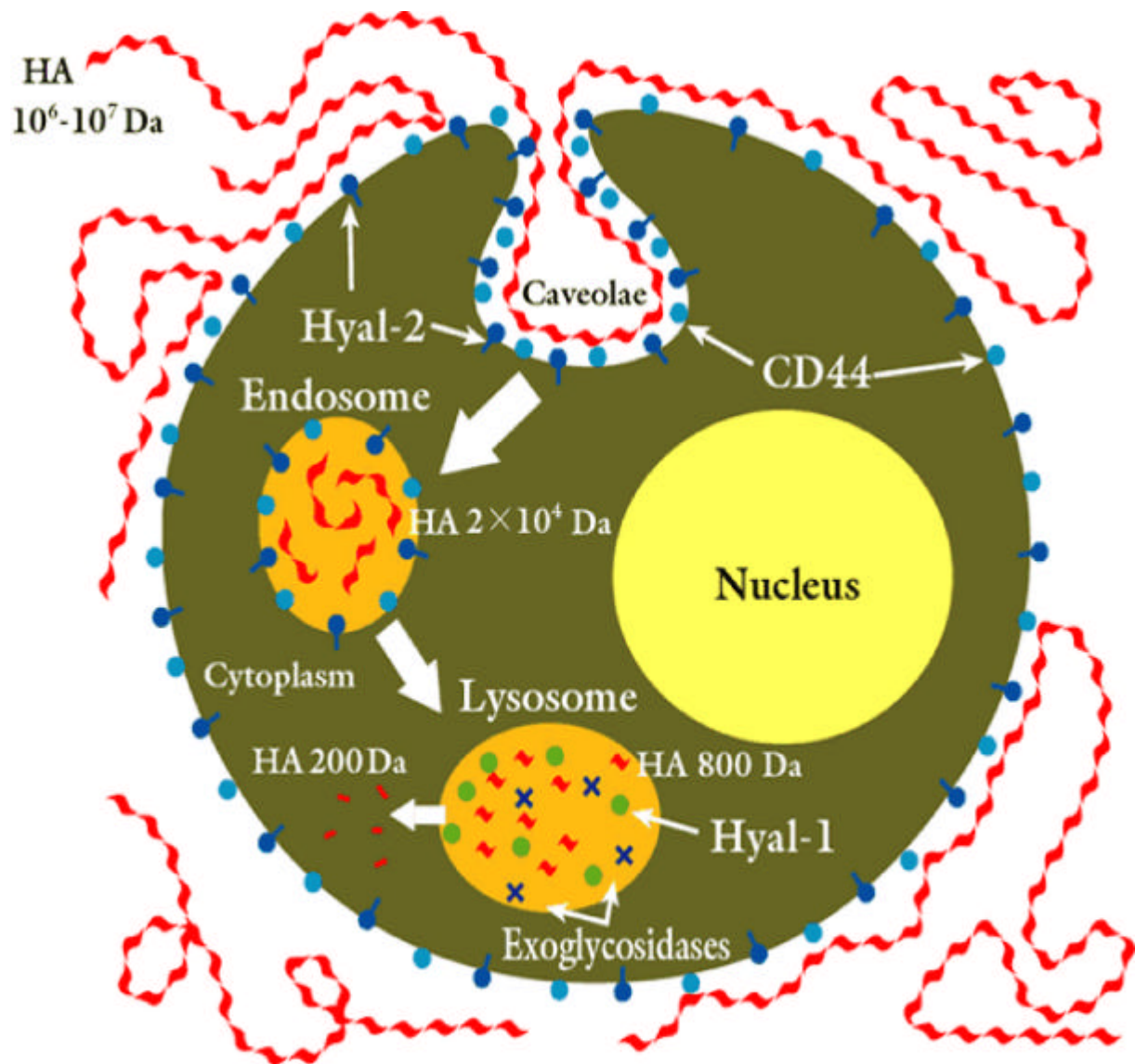
1.6) L'hyaluronan et cancer

La concentration de HA augmente dans certains cas de cancer : adénocarcinome pulmonaire et cancer de la prostate (augmentation de la concentration stromale de HA), carcinome rénal (augmentation de la concentration de HA dans l'urine), cancer du sein (augmentation de la concentration sérique de HA), cancer de la tête et du cou (augmentation de la concentration de HA dans la salive). Cependant, il n'y a pas de corrélation entre le niveau de HA et la progression des mélanomes ou de certains carcinomes de l'épiderme (Toole, 2004).

1.7) Métabolisme de l'hyaluronan

1.7)1 Les hyaluronidases

Selon Aronson et De Duve (année 1968), la dégradation subcellulaire de l'HA dans le foie de rat est assurée par des enzymes lysosomales, les hyaluronidases et deux exoglycosidases (β -glucuronidase et N- β -acétyl-glucosaminidase). Le modèle de catabolisme proposé en 2003 par Stern présente deux types de hyaluronidases, Hyal-1 et Hyal-2. Une enzyme non lysosomale (Hyal-2) qui clive l'HA en oligosaccharides d'une certaine taille et une autre hyaluronidase, lysosomale (Hyal-1) qui dégrade ces derniers en oligosaccharides de taille plus petite. Ces nouveaux fragments sont alors utilisés par les deux β -exo-glucosidases qui les découpent en GlcUA et GlcNAc (dans 85% des cas) ou en disaccharides (dans 15% de cas). Les monosaccharides pourraient ensuite quitter les lysosomes pour être recyclés ou métabolisés dans le cytoplasme ; on ignore, par contre, le sort des disaccharides.



<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA15a/HA15aE.html>

Fig. 2. Un mécanisme possible pour la dégradation de l'HA (Stern, 2004)

Plus récemment, il a été proposé que IHA serait internalisé dans les cellules grâce à l'effort combiné du récepteur CD44, de l'échangeur $\text{Na}^+\text{-H}^+$ et de l'enzyme hyaluronidase Hyal-2 (Csoka et al. 2001 ; Stern et Csoka, 2004). Il se formerait une invagination de la membrane plasmique enrichie en cavéoline dans laquelle l'Hyal-2 serait activée ; dès lors, cette dernière enzyme deviendrait capable de cliver l'HA en fragments de 20kDa (50 unités de disaccharides), lesquels seraient délivrés dans les endosomes, et finalement dans les lysosomes pour être hydrolysés par Hyal-1 en di-et tétrasaccharides (Fig. 2).

Ensuite, ces nouveaux produits seraient pris en charge par les deux β -exoglycosidases lysosomales (cfr ci haut) (Csoka et al. 2001) pour former, entre autres, des monosaccharides (GlcUA et GlcNAc) susceptibles de quitter les lysosomes, soit par simple diffusion, soit grâce à des transporteurs spécifiques (Stern, 2004).

Stern a proposé également l'existence de l'hyaluronasome, un organite subcellulaire spécifique assurant le métabolisme de l'HA. L'hyaluronasome serait localisé à la face cytoplasmique de la membrane plasmique et constituerait une unité fonctionnelle qui contiendrait l'HA et toutes les molécules qui sont importantes pour le métabolisme de HA : les récepteurs CD44 et RHAMM, des HAS, des hyaluronidases, des inhibiteurs des hyaluronidases et des β -exoglycosidases (Stern, 2004). L'hyaluronasome serait ainsi un lieu de synthèse, ainsi que de dégradation de l'HA, deux processus régulés par des mécanismes de feed-back impliquant des senseurs. Ces derniers informeraient la cellule des niveaux de HA déjà synthétisé (Stern, 2003).

A) Historique et classification des hyaluronidases

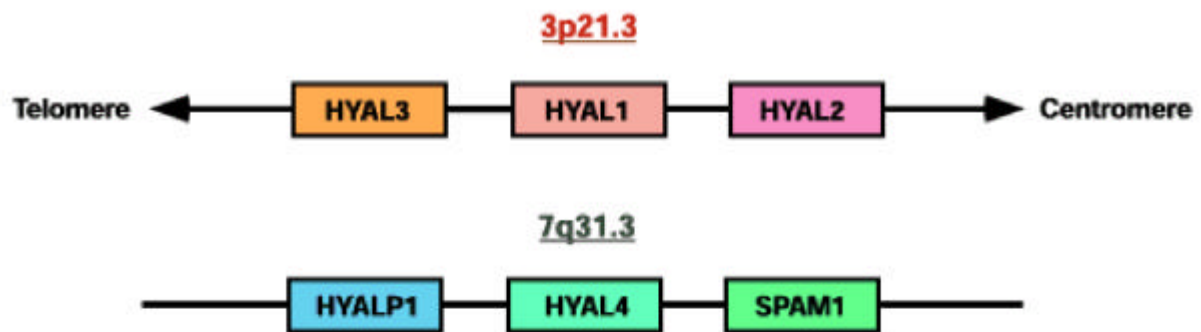
La classification des hyaluronidases a été formulée pour la première fois par Karl Meyer (en 1971) en se basant sur des analyses biochimiques des enzymes et les produits de leurs réactions :

- Les hyaluronidases bactériennes
- Les hyaluronidases isolées des sangsues, quelques autres parasites et crustacés
- Les hyaluronidases mammaliennes : sont des enzymes hydrolytiques (aussi des transglycosidases), générant surtout des tétra-et hexa saccharides. Elles ne possèdent pas une spécificité absolue pour l'HA ; elles peuvent aussi hydrolyser la chondroïtine et la chondroïtine-sulfate (Stern 2003, 2004).

B) Hyaluronidases et gènes HYAL

Les hyaluronidases sont des protéines codées à partir d'un groupe de six gènes chez l'être humain : HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, PHYAL1 (pseudo gène) et SPAM1 (Sperm Adhesion Molecule). Ces gènes partagent 40% d'identité entre eux (Stern et Csoka, 2000).

A. Chromosomal Orientation Of Hyaluronidase Genes



B. Hyaluronidase Genes and their gene products:

	<u>Gene</u>	<u>Protein</u>
3p21.3	HYAL1	Hyal-1
	HYAL2	Hyal-2
	HYAL3	Hyal-3
7q31.3	HYAL4	Hyal-4
	SPAM1	PH-20
	HYALP1	None

Fig. 3. Organisation chromosomique de six gènes hyaluronidases et leurs produits.

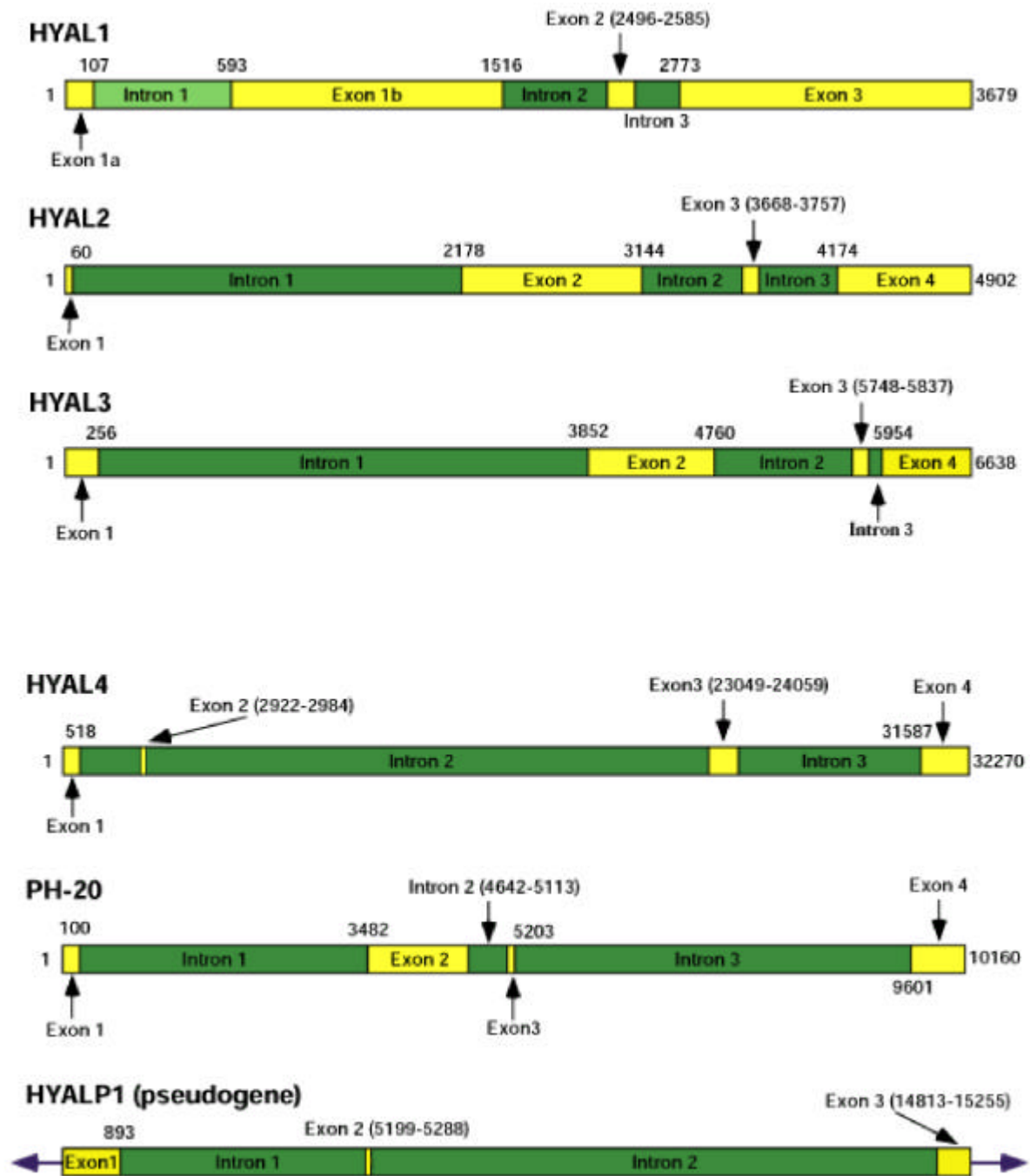


Fig. 4. Structure génomique des gènes hyaluronnnidases

Ils forment deux "clusters" localisés sur deux chromosomes différents. Les gènes HYAL1, HYAL2 et HYAL3 sont situés sur le chromosome 3p21.3 et codent respectivement les enzymes Hyal-1, Hyal-2, Hyal-3, tandis que les gènes HYAL4 (code pour l'enzyme Hyal-4), PHYAL1 (pseudo gène : donc, non exprimé) et SPAM1 (code pour PH-20) se trouvent sur le chromosome 7q31.3 (Figure 3-A,B) (Stern, 2003, 2004). Tous ces gènes présentent trois introns et quatre exons, sauf le pseudo gène PHYAL1 qui ne possède que deux introns et trois exons (Fig. 4). Quant à leurs tailles, le gène HYAL4 est le plus grand (~ 32kb) et le gène HYAL1 possède la plus petite taille (~3,7kb) (Stern et Csoka, 2004).

HYAL 5 (codant pour l'enzyme Hyal 5) vient d'être découvert chez la souris et il a été démontré que ce gène forme un "cluster" de 160 kpb avec les gènes HYAL4, PHYAL1 et SPAM1.

Une telle distribution chromosomale suggère que cette famille de gènes dérive de deux gènes ancestraux par des duplications répétées (Csoka et al. 2001).

C) Localisation et activité enzymatique des hyaluronidases

Les hyaluronidases ont été découvertes pour la première fois dans les testicules (Aronson et Davidson, 1965). Les hyaluronidases catalysent l'hydrolyse des liaisons β (1,4) entre les unités disaccharides de l'acide hyaluronique.

Les hyaluronidases des ganglions lymphatiques dégradent 90% de l'HA avant qu'il ne rejoigne le flux sanguin. Le foie et les reins sont des organes majeurs pour la dégradation de l'HA présent dans la circulation. Les sites de dégradation sont des cellules hépatiques ou rénales ayant des récepteurs spécifiques pour l'HA. On a constaté que l'occlusion des vaisseaux hépatiques ou rénaux a comme conséquence l'augmentation du niveau d'HA dans le sang.

Les hyaluronidases de la peau et du sperme (PH-20) ont une activité optimale respectivement à pH 3,7 et à pH neutre. Les hyaluronidases se retrouvent également dans les os (Vaes, 1967).

D) Hyal-1

Structure

Il existe deux isoformes d'Hyal-1 :

Hyal-1 plasmatique

L'Hyal-1 du plasma sanguin a été isolée par Frost et ses collaborateurs en 1997. C'est une enzyme glycoprotéique de 57kDa, longue de 435 acides aminés ; elle est active en milieu acide et présente 40% d'identité avec l'enzyme spécifique du sperme (humain), la PH-20 et 73% d'identité avec son orthologue chez la souris.

Hyal-1 de l'urine

Ginetzinsky et ses collaborateurs ont identifié cette enzyme dans l'urine en 1974. L'Hyal-1 urinaire possède une activité spécifique environ 100 fois supérieure à celle du plasma (Csoka et al. 2001) et présente deux formes : l'une de 57kDa et une autre de 45 kDa. La forme courte résulte d'une suppression d'environ 100 acides aminés de la région carboxyterminale de la forme longue par deux clivages endoprotéolytiques, donnant ainsi deux chaînes de polypeptides qui restent attachées par un pont dissulfure (Fig. 5). Le rôle de la forme courte (45kDa) n'est pas connu et il faut encore déterminer si elle est produite au niveau du rein.

Organisation génétique

Comme déjà dit plus haut, le gène responsable de l'expression de la protéine Hyal-1 est HYAL1 se trouvant sur le chromosome 3p21.3. L'ADNc pour Hyal-1 est long de 2507kb (Frost et al. 1997). Hyal-1 possède six variants résultant du "splicing" du gène HYAL1 et seule la forme la plus longue (435 aa) est active (Lokeshwar et al. 2002).

Localisation

Sur base des analyses en Northern blotting, on a mesuré beaucoup d'ARNm d'Hyal-1 (2,6 kb) dans le foie, les reins et le cœur. Très peu de cette enzyme a été révélée dans les poumons et les muscles squelettiques. Elle reste sous forme de traces dans le pancréas et est absente dans le cerveau (Frost et al. 1997 ; Lerman et Minna, 2000). L'Hyal-1 est aussi présente dans la peau, la rate (Csoka et al. 2001 ; Shuttleworth et al. 2002), le sérum et l'urine (unique hyaluronidase présente).

Des controverses existent en ce qui concerne la localisation subcellulaire des hyaluronidases.

Les hyaluronidases (dont Hyal-1) seraient lysosomales en accord avec leurs activités à pH acide (excepté PH-20, active à pH neutre) (Heldin, 2003) (cfr Fig. 2).

Activité enzymatique

La spécificité d'Hyal-1 n'est pas absolue. Non seulement, cette enzyme catalyse l'hydrolyse des liaisons β -(1,4) glycosidiques, entre N-acétyl-D-glucosamine et l'acide D-glucuronique, mais elle peut également cliver la chondroïtine-sulfate (Csoka et al. 2001). Les conditions de pH propice pour l'activité d'Hyal-1 restent incertaines : pH=3,5-3,7 (Stern et Csoka, 2000) ; pH=4,0-4,3 (Lokeshwar et al. 2002) ; pH=3,8 (Stern, 2003).

Hyal-1 et cancer

Plus haut, nous avons signalé que la concentration (stromal, sérique, urinaire ou salivaire) de HA augmentait en cas de cancer (cfr. le point 1.6), ce qui laisse supposer, soit une augmentation de l'activité des HA synthases (HAS), soit une diminution de l'activité des hyaluronidases (Hyal-1 entre autres), ou bien encore, une mutation du gène HYAL1 (aussi connu comme LUCA-1). Dans certains cas de cancers (cancer de la prostate, par exemple), le taux des hyaluronidases (souvent, Hyal-1) augmente également (Toole, 2004).

Il a été montré également lors d'une transfection stable de cellules cancéreuses de la vessie avec Hyal-1 que l'expression de cette enzyme régule la croissance de la tumeur et sa progression (Lokeshwar et al. 2005).

Un manteau de HA autour de la tumeur ferait perdre le contact avec les autres cellules et offrirait une protection contre la surveillance immunitaire (limitation de la rencontre des cellules cancéreuses, par exemple avec les anticorps et les lymphocytes T) (Gatphayak, 2003). Ainsi, suite à l'activité hydrolytique d'Hyal-1, les cellules cancéreuses seraient plus accessibles au système immunitaire.

Hyal-1 et autres maladies

Une déficience en Hyal-1 est déjà associée à des maladies, comme la cryptorchidie, la mucopolysaccharidose IX, et la sclérodermie.

La mucopolysaccharidose IX est due à une déficience d'Hyal-1 à cause de mutations au niveau du gène HYAL1 (Triggs-Raine et al. 1999).

La cryptorchidie (la descente incomplète des testicules dans le scrotum) est provoquée par un déséquilibre entre le développement du gubernaculum d'une part et le métabolisme de l'HA d'autre part, pendant le développement du fœtus. À partir des expériences faites sur des porcins, on a montré que la dégradation sélective de HA a lieu dans le gubernaculum au niveau des lysosomes, sous l'influence de hyaluronidases actives en milieu acide (pH 2,5-3,5) (Gatphayak, 2003).

La sclérodémie est associée à une forte baisse de l'activité d'Hyal-1, surtout lorsque la maladie est avancée (plus de 2 ans) (Neudecker et al. 2004).

E) Autres enzymes de la famille Hyal

Hyal-2

Hyal-2 serait activée dans une invagination de la membrane plasmique où elle cliverait l'HA en des produits constitués de 50 unités de disaccharides (20 kDa).

Hyal-3

Il existe quatre variants d'Hyal-3 (48-, 45-, 20- et 16kDa) et seule la forme la plus longue est active au pH=4,2 (les autres ne présentent pas d'activité enzymatique).

Hyal-4

L'Hyal-4 est une chondroïtinase, la première enzyme de ce type identifiée chez les vertébrés ; elle ne possède pas d'affinité pour l'HA (Stern et Csoka, 2004).

PHYAL1

PHYAL1 est considéré comme un pseudogène chez les humains, mais comme un gène chez la souris.

PH 20 et Hyal-5 (découverte uniquement chez la souris)

Elles seraient impliquées dans la traversée du spermatozoïde à travers les barrières de l'ovocyte (cumulus oophorus et zone pellucide) (Ekyune et al. 2005).

2) **MODIFICATION SELECTIVE DE LA DENSITE DES LYSOSOMES**

Pour localiser sans ambiguïté un composant dans les lysosomes, on fait généralement appel à l'utilisation de Triton WR-1339 afin de pouvoir modifier sélectivement la densité de ces organites. Cette substance captée par endocytose s'accumule dans les lysosomes en entraînant une augmentation de leur taille et une diminution de leur densité. Cette molécule exogène pénètre dans les cellules par un mécanisme d'endocytose car son poids moléculaire est trop important pour qu'elle puisse pénétrer par simple diffusion. Elle s'accumule dans les lysosomes puisqu'il n'existe pas d'enzyme lysosomale capable d'hydrolyser ce détergent (Wattiaux, 1966). Le phénomène s'accompagne d'une accumulation de lipides, probablement dérivés des VLDL sériques dont le taux est augmenté par le traitement (Hayashi, 1982). Malheureusement, ce détergent est souvent toxique pour les cellules en culture.

2.1) **Surcharge des lysosomes en cholestérol**

Le cholestérol est un constituant structurel important des membranes plasmiques. Les cellules humaines l'utilisent également pour la synthèse des hormones stéroïdes. Les LDL-cholestérols captés par les récepteurs de la surface cellulaire sont endocytés et se retrouvent dans les endosomes puis dans les lysosomes où ils sont hydrolysés par des lipases acides pour produire des molécules libres de cholestérol (selon d'autres chercheurs, cette hydrolyse se passerait déjà dans les endosomes précoces). Ensuite, les cholestérols libres arrivent dans les endosomes tardifs, puis dans les lysosomes. Les cholestérols libres quittent les lysosomes dans des vésicules et sont transportés aux sites où ils sont utilisés : le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique. La mobilisation de cholestérol lysosomal libre est médiée par la protéine membranaire (NPC1), encodée par un gène qui, muté, produit la maladie de surcharge lysosomale (Niemann-Pick de type C) (Chang et al. 2005 ; Watari et al. 2000 ; Liscum et al. 1999).

A) **Transport du cholestérol hors des lysosomes**

Comme vu ci-dessus, le LDL (du sérum de veau quand il s'agit de cellules en culture) est internalisé, puis acheminé vers le lysosome où se fait l'hydrolyse de LDL-cholestérol. Le cholestérol libre quitte le lysosome à bord d'une vésicule pour être transporté dans la membrane plasmique (dans 70% des cas) par une voie dépendante de l'appareil de Golgi. Cette voie est inhibée par la progestérone (cfr. plus bas). Une portion de LDL cholestérol est

transportée des lysosomes vers le réticulum endoplasmique (dans 30% des cas) par une voie dépendante de l'énergie (Liscum et al. 1999 ; Brasaemle et al. 1990 ; Johson et al. 1990).

B) La protéine Niemann-Pick type C1 (NPC1)

Structure et localisation

La NPC1 est une glycoprotéine longue de 1278 acides aminés et semble être une protéine membranaire intégrale des endosomes tardifs (Higgins et al. 1999). Cette glycoprotéine de 170 à 190 kDa possède un signal peptidique pour le réticulum endoplasmique, 13 domaines transmembranaires possibles et un motif de ciblage pour l'endosome tardif ou le lysosome. Un des domaines transmembranaires est sensible aux stérols (long de 180 acides aminés) et reconnaît donc le cholestérol.

Organisation génétique

Le gène humain NPC1, localisé sur le chromosome 18 q11-12, est long de 47 kb et contient 25 exons (Morris et al. 1999 ; Carstea et al. 1997). Ce gène est responsable de 95% de cas cliniques de la maladie Niemann-Pick de type C. Les cinq autres pourcents sont liés au gène HE1 (codant pour la protéine NPC2) (Naureckiene et al. 2000 ; Liscum et al. 2000 ; Vanier et al. 1996 ; Steinberg et al. 1994). Plus de 80 mutations ont été décrites chez les patients NPC1 (Millat et al. 1999, 2001 ; Sun et al. 2001).

Synthèse

Cette protéine est synthétisée dans le réticulum endoplasmique, après quoi elle passe par le trans Golgi et ensuite atteint l'endosome tardif.

Fonction

La protéine NPC1 est requise pour le transport du cholestérol hors des lysosomes grâce à son domaine sensible aux stérols. La NPC1 est une protéine transporteuse de cholestérol, mais également d'autres lipides.

Les LDL-cholestérols sont digérés dans les endosomes tardifs et les lysosomes. Des vésicules qui se forment à partir des endosomes tardifs possèdent la même composition membranaire que celle de ces derniers, et la protéine NPC1 serait requise pour le transfert des lipides membranaires (cholestérol entre autres) des endosomes tardifs vers les membranes de ces vésicules. La fonction de la NPC1 pourrait être affectée par la

composition des lipides membranaires. La NPC1 médierait ensuite le transport de ces vésicules formées vers des cibles comme par exemple, le trans-Golgi network (Liscum et al. 2000).

Des études du mouvement de la protéine NPC1 utilisant une protéine GFP fusionnée à la NPC1 dans des cellules en culture ont démontré que les vésicules possédant la NPC1 montraient des mouvements rapides antérogrades et rétrogrades le long des microtubules, ce qui suggère que ces vésicules font des contacts brefs avec divers organites où elles libèrent leurs contenus. De plus, ces mouvements requièrent un domaine sensible aux stéroïls intact (Strauss et al. 2002 ; Zhang et al. 2001).

Il a été montré également que l'accumulation de cholestérol dans les cellules Niemann-Pick type C supprimait le mouvement des endosomes tardifs (portant la NPC1), grâce au domaine sensible aux stéroïls qui pourrait percevoir l'augmentation du niveau de cholestérol et l'utiliser comme signal (Strauss et al. 2002 ; Zhang et al. 2001 ; Ko DC et al. 2001 ; Liscum et al. 1999).

Il se pourrait que les cellules soient capables de sentir l'efficacité de la fonction de la protéine NPC1. Lors d'un traitement avec des agents qui bloquent la fonction de NPC1 (progestérone et le stéroïde U18666A), les cellules augmentent le niveau de NPC1 et celui de son ARNm (Strauss et al. 2002 ; Wattari et al. 2000).

C) La protéine Niemann-Pick type C2 (NPC2)

La NPC2 est une glycoprotéine soluble lysosomale d'environ 18 kDa codée par le gène (HE1 : épидидyme humain) localisé sur le chromosome 14q24.3. Le taux d'ARNm du gène HE1 est élevé dans le testicule, le rein et le foie (Naureckiene et al. 2000). La NPC2 utilise un signal mannose-6-phosphate pour son ciblage vers les endosomes tardifs (Willenborg et al. 2005) ; elle a une forte affinité pour le cholestérol et pourrait être une molécule transporteuse de cholestérol de la bicouche lipidique à une protéine transmembranaire, comme par exemple la NPC1.

La NPC2 utiliserait les mêmes voies de transport de lipides (cholestérol entre autres) que la NPC1, mais la NPC1 ne corrige pas la surcharge lysosomale en cholestérol dans les cellules déficientes en NPC2 et inversement, celle-ci ne corrige pas l'accumulation de cholestérol dans les cellules avec une déficience en NPC1 (Strauss et al. 2002).

D) La progestérone comme agent bloquant le transport du cholestérol hors des lysosomes

La progestérone inhibe le transport du cholestérol venant de lysosome vers la membrane plasmique dans les fibroblastes humains en culture (Maxfield et Wüstner, 2002 ; Frolov et al. 2003). La progestérone pourrait bloquer la fonction de NPC1 provoquant ainsi l'accumulation de cholestérol (Liscum, 2000) dans les lysosomes de ces cellules. Par effet de régulation, la quantité de messenger et de protéine de NPC1 augmente (Strauss et al. 2002). La quantité de protéine NPC1 augmente par exemple de deux à trois fois dans des cellules fibroblastiques en culture traitées avec la progestérone (Patel et al. 1999), fait qui s'explique par une augmentation de la traduction des messagers de NPC1 (dont la quantité a augmenté) ou par réduction de la dégradation de la protéine NPC1 (Strauss et al. 2002).

L'accumulation du cholestérol (sous la forme non estérifiée) dans les lysosomes des cellules du granulosa en culture traitées avec de la progestérone provoque un phénotype qui ressemble à celui de la maladie de Niemann-Pick type C (Garver et al. 2000). Une situation similaire s'observe également dans les lysosomes des cellules de la souche NCTR de souris BALB/c (Morris et al. 1982) et chez le modèle des souris NPC1-/- (Liu et al. 2000).

La surcharge de cholestérol sous l'effet de la progestérone est un phénomène réversible dans les fibroblastes humains normaux (Butler D. et al., 1992) (Cfr. point 2.1.F)

E) Transport postlysosomal de cholestérol dans les cellules Niemann-Pick type C

La maladie de Niemann- Pick type C est une maladie récessive autosomale manifestant une accumulation de cholestérol non estérifié dans les lysosomes (Vanier et al. 1991 ; Pentchev et al. 1994). Le lien entre la maladie de Niemann-Pick de type C et le métabolisme de cholestérol était établi pour la première fois par Pentchev et ses collaborateurs en 1985.

Dans les fibroblastes des patients atteints par la maladie Niemann-Pick type C, la capture et l'hydrolyse de LDL-cholestérol sont normales, alors que le transport de cholestérol libre hors de lysosomes est affecté conduisant au gonflement de ces organites suite à la surcharge en cholestérol. Cette situation favorise ainsi une augmentation dérégulée du niveau de cholestérol cellulaire (Liscum et al. 1999 ; Blanchette-Mackie et al. 1988).

Il a été montré qu'une transfection avec un ADNc de la protéine NPC1 dans les fibroblastes de patients atteints de Niemann-Pick type C a permis la correction de leur surcharge excessive en cholestérol, ce qui explique le rôle crucial de NPC1 dans la régulation du trafic intracellulaire du cholestérol (Pentchev et al. 1997).

F) Transport postlysosomal de cholestérol dans les mutants NPC1 fibroblastiques humains

Les résultats d'une incubation en présence des LDL des mutants fibroblastiques NPC1 ont montré une accumulation excessive de cholestérol non estérifié dans les lysosomes de ces cellules. Le fractionnement subcellulaire de ces fibroblastes mutés a mis en évidence des lysosomes allégés suite à la surcharge en cholestérol. De plus, une modification spécifique des profils de marqueurs d'enzymes de lysosomes a été démontrée. L'activité de β -hexosaminidase dans un gradient de Percoll a partiellement migré de la fraction lysosomale lourde à la fraction lysosomale légère (Pentchev et al. 1987).

Le niveau de cholestérol non estérifié est deux fois supérieur dans les fibroblastes humains normaux, mis en culture en présence de LDL et de la progestérone, par rapport aux fibroblastes normaux cultivés uniquement en présence de LDL. La surcharge de cholestérol dans les lysosomes des fibroblastes normaux est levée lorsque la progestérone est retirée du milieu de culture, mais pas dans les mutants fibroblastiques NPC. Cependant, la restauration du transport postlysosomal de cholestérol après l'extraction de la progestérone est inhibé par la présence du stéroïde U18666A signifiant que ce dernier induit l'accumulation de cholestérol dans les lysosomes (Zhao et al. 2006 ; Butler et al. 1992).

G) Transport postlysosomal de cholestérol chez les souris NPC1-/-

Une étude faite sur des souris avec une mutation inactivant le gène NPC1 a permis de mettre en évidence que ces souris manifestent les mêmes caractéristiques génétiques, pathologiques et cliniques avec la maladie Niemann-Pick type C. Des observations en microscopie électronique à transmission ont permis de voir que les lysosomes de leurs neurones sont enflés et surchargés des inclusions lamellaires abondantes (Liu et al. 2000).

H) Transport postlysosomal de cholestérol chez les souris BALB/c

Les souris BALB/c (Manford et al. 1982), quant à elles, souffrent d'une maladie héréditaire entraînant des dysfonctions neurologiques progressives et une mort prématurée. Leurs tissus contiennent des quantités excessives de cholestérol. Une colonie de ces souris appelées NCTR a été étudiée et identifiée comme souffrant d'une maladie de surcharge lysosomale en lipides. Le cholestérol non estérifié est parmi les principaux produits d'accumulation. Le taux de cholestérol augmente de huit à neuf fois par rapport au contrôle. Les activités de certaines enzymes lysosomales sont plus élevées que chez des souris témoins.

Des études en MET, faites sur le foie de souris NCTR BALB/c, ont permis de mettre en évidence la présence d'inclusions. Ces inclusions sont considérées comme étant des grandes vacuoles délimitées par une membrane, avec des régions "transparentes aux électrons" qui

semblent résulter de l'extraction des lipides durant le traitement du tissu. Parfois, ces vacuoles présentent des signes d'autophagie ou contiennent des corps lamellaires. Une étude cytochimique y a révélé la phosphatase acide indiquant qu'il s'agit des lysosomes, une preuve qu'il s'agit d'une maladie de surcharge lysosomale (Morris et al. 1982).

3) BUT ET DÉMARCHE DU TRAVAIL

3.1) But

Notre travail s'inscrit dans une recherche menée au laboratoire concernant la localisation subcellulaire d'**Hyal-1**.

Cette enzyme est en effet généralement considérée dans la littérature comme étant lysosomale, cependant aucune preuve expérimentale n'a jamais été donnée à ce propos. Des arguments en faveur de la localisation lysosomale d'**Hyal-1** sont le pH optimal acide de l'enzyme compris entre 3,5 et 3,8 (Stern, 2003 ; Stern et Csoka, 2000), et le fait que la déficience en **Hyal-1** plasmatique provoque une maladie de surcharge lysosomale : la mucopolysaccharidose IX (Triggs-Raine et al, 1999).

Cependant, **Hyal-1** présente parfois un comportement non concordant avec une localisation lysosomale. Des observations sur les patients atteints de "I-Cell disease" montrent également qu'**Hyal-1** n'a pas le même comportement que les autres enzymes lysosomales. Cette maladie consiste en une déficience de la N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase, responsable de la fixation d'un signal mannose-6-phosphate sur les enzymes destinées aux lysosomes. En l'absence de ce signal, les enzymes sont sécrétées et l'on observe, dans le plasma des personnes atteintes de "I-cell disease", une augmentation de l'activité des enzymes lysosomales. Cette situation ne s'observe pas pour **Hyal-1** (Stern, 2004), ce qui laisse supposer soit que celle-ci ne serait pas une enzyme lysosomale, soit qu'elle serait dirigée vers les lysosomes par un mécanisme différent de la voie du mannose-6-phosphate. Enfin, aucun argument ne permet d'expliquer la présence passive d'**Hyal-1** dans le plasma sanguin.

Une recherche a donc été menée au laboratoire pour tenter de localiser **Hyal-1** dans le foie de rat et le foie de souris. Les résultats obtenus sont tout à fait en défaveur d'une localisation lysosomale de l'enzyme. **Hyal-1** étant présente en abondance dans le sang, la possibilité d'une contamination de l'organe, même perfusé, par du sang résiduel et menant à des situations artéfactuelles ne peut être exclue totalement. L'objet de ce mémoire a donc été de nous poser la même question à propos d'un système cellulaire. Nous avons choisi les cellules d'hépatocarcinome humain HepG2, car elles sont décrites comme étant les plus riches en ARNm d'**Hyal-1** (Genomics Institute of the Novartis Research Foundation, 2004) et nous avons vérifié par immunoblotting (voir matériels et méthodes) l'absence totale de signal correspondant à **Hyal-1** dans le sérum de veau fœtal utilisé pour la culture. Notons de plus que l'utilisation de cellules en culture présente aussi d'autres avantages. Ce matériel pourrait permettre l'étude de la biosynthèse d'**Hyal-1** et faciliterait l'utilisation des outils de la biologie moléculaire.

3.2) Démarche expérimentale

A. Mise au point d'une méthode d'allègement des lysosomes des cellules HepG2

Pour localiser sans ambiguïté un composant dans les lysosomes, on a généralement recours à l'allègement de la densité de ces organites en utilisant le Triton WR-1339. Ce détergent est souvent toxique pour les cellules. C'est en particulier le cas pour HepG2.

Nous avons donc tenté de mettre au point une méthode d'allègement des lysosomes par l'addition de progestérone dans le milieu de culture. En effet, cette substance est décrite comme un inhibiteur du transfert du cholestérol hors des lysosomes avec pour conséquence une surcharge en lipides de ces organites. Une situation similaire s'observe dans la souche NCTR de souris BALB/c (Morris et al. 1982), ainsi que dans les lysosomes des neurones des souris NPC1^{-/-} (Liu et al. 2000) et dans ceux des cellules des patients atteints de la maladie de Niemann-Pick type C (Liu et al. 2000).

B. Localisation subcellulaire d'Hyal-1

Notre méthode d'allègement des lysosomes une fois mise au point, nous avons comparé la distribution d'**Hyal-1** avec celle des lysosomes après centrifugation différentielle de l'homogénat ainsi qu'après centrifugation isopycnique en gradient de saccharose de la fraction post nucléaire sédimentable. Nous avons eu recours à la détection immunologique d'**Hyal-1** en utilisant un anticorps monoclonal (don du Dr. B. Triggs-Raine) contre la forme recombinante de la protéine **Hyal-1** afin de mettre en évidence cette protéine.

II) MATÉRIELS ET MÉTHODES

1) Culture cellulaire

Les cellules HepG2 (hépatocarcinome humain) sont cultivées à 37°C dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium : 4,5 glucose + L-Glutamine) additionné de sérum de veau foetal (10%), de pénicilline (100.000U/l) et de streptomycine et en présence de 5% de CO₂ dans des boîtes " Falcon " (T75 ou Pétri). Elles adhèrent au plastique et se multiplient jusqu'à confluence.

Dès leur arrivée à confluence, les cellules sont repiquées dans des nouvelles boîtes T75 pour l'entretien, ainsi que dans des boîtes de Pétri « Falcon » pour les fractionnements.

La solution de progestérone dissoute dans l'éthanol absolu à raison de 2mg/ml est ajoutée dans les boîtes de culture 12 h, 24 h ou 48h avant l'expérience.

2) Préparation d'homogénats cellulaires

Les monocouches d'HepG2 sont rincées trois fois avec 5ml de solution de saccharose 0,25M (isotonique) glacé, ensuite, elles sont raclées dans 2ml de saccharose 0,25M à l'aide d'un racloir et transférées dans des tubes coniques.

Les cellules récoltées sont alors centrifugées à 0° C à la centrifugeuse « Sorvall Instruments » pendant 10 minutes à une vitesse de 1000 RPM afin d'obtenir le culot de cellules.

L'homogénéisation des cellules est réalisée par 5 passages d'un piston serré dans l'homogénéiseur de Dounce de 7ml (Kontes Glass Co). L'homogénat ainsi préparé contient tous les organites subcellulaires des cellules HepG2.

3) Fractionnement complet par centrifugation différentielle

L'homogénat de cellules HepG2 est soumis au fractionnement par centrifugation différentielle c'est-à-dire à des vitesses de plus en plus élevées de façon à ce que les organites subcellulaires puissent sédimenter en fonction de leur taille, du plus gros au plus petit, selon le schéma de Duve et al. (1955) en tenant compte des adaptations proposées par Remacle et al. (1980). Nous avons ainsi obtenu cinq fractions hétérogènes :

- La fraction N est constituée essentiellement de noyaux, de gros débris de membrane plasmique et de réticulum et de cellules intactes ayant résisté à l'homogénéisation.

- La fraction M, ou mitochondriale lourde, renferme, quant à elle, des mitochondries mais aussi des lysosomes et des peroxysomes en quantité appréciable.
- La fraction L est enrichie en lysosomes et en peroxysomes.
- La fraction P contient pour sa part des microsomes provenant des éléments du réticulum endoplasmique et du Golgi, ainsi que des fragments de la membrane plasmique.
- La fraction S, ou fraction soluble est constituée de tous les éléments non sédimentables de la cellule dans ces conditions.

Nous avons réalisé une fraction sédimentable post nucléaire (MLP) en centrifugation différentielle pour la déposer ensuite sur un gradient continu de saccharose. Pour la fraction MLP, l'extrait E est centrifugé à 39000 RPM (rotor 40, centrifugeuse Becchman) pendant une durée qui dépend du volume à centrifuger.

4) Centrifugation isopycnique en gradient continu de saccharose

En centrifugation isopycnique, les particules sont centrifugées dans un gradient de densité jusqu'à ce qu'elles occupent la position correspondant à leur densité d'équilibre ; à ce moment leur vitesse de sédimentation est devenue nulle. Dans ce cas, la séparation des granules se fait selon un critère de densité.

Une fraction MLP est déposée au sommet d'un gradient linéaire de saccharose dont les limites de densité sont 1,09 / 1,26 (g/ml). Il est soumis à une centrifugation en rotor à godets basculants SW 55 Ti pendant 2h 30 à 39000RPM.

Après centrifugation, le tube est découpé en sections parallèles afin de récupérer les différentes fractions de densités croissantes.

L'activité des enzymes de référence est mesurée dans chacune des fractions issues des fractionnements et des gradients : témoin (cellules cultivées sans progestérone) et test (cellules mise en présence de la solution de progestérone pendant 12, 24 ou 48 heures).

5) Les enzymes de référence

La concentration relative des divers organites présents dans les fractions isolées par centrifugation (différentielle ou isopycnique) est estimée en mesurant dans ces fractions l'activité d'enzymes associées à un type donné de granules.

Organites subcellulaires	Enzymes	Substrats	Mesure	Références
Lysosomes	β -Galactosidase	Méthylumbé-liféryl-galactoside	Fluorimétrie du 4-Méthylumbé-liférone	Peters et al. (1974)
	Cathepsine C	H-gly-Arg-AMC hydrochloride Salt	Fluorimétrie de la Méthyl Coumarine	Jadot et al. (1984)
Mitochondries	Cytochrome oxydase	Cytochrome C réduit	Spectrophotométrie du Cytochrome réduit	Appelmans et al. (1955)
Peroxisomes	Catalase	H ₂ O ₂	Spectrophotométrie de la disparition de H ₂ O ₂	Aebi et al. (1984)
Membrane plasmique	Phosphodiesterase-alcaline	Thymidine 5' mono-phosphate p-nitro-Phényl ester	Colorimétrie du p-nitrophénol	Beaufay et al. (1974)
Réticulum endoplasmique	α -Glucosidase alcaline	4-Méthylumbé-liféryl α -D-glucopyranoside	Fluorimétrie du 4-Méthylumbé-liférone	Peters et al. (1972)

Tableau 1 : Résumé des conditions de dosages enzymes mesurées.

Les enzymes testées pour caractériser les organites (voir tableau 1) sont, pour :

- les lysosomes : la β -galactosidase, la cathepsine C
- les peroxysomes : la catalase
- les mitochondries : la cytochrome-oxydase
- la membrane plasmique : la phosphodiesterase alcaline
- le réticulum endoplasmique : l' α -glucosidase alcaline

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry et al. 1951.

6) **Western-Blotting** (Mise en évidence des protéines Hyal-1 et Lamp-1)

Cette méthode est utilisée afin de détecter la présence d'une protéine dans un échantillon à l'aide d'un anticorps spécifique de cette protéine.

Le mélange de protéines est soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Sous l'influence d'un champ électrique, les protéines chargées négativement par le détergent vont migrer vers l'anode en fonction de leur poids moléculaire.

Préparation des gels

Les gels sont préparés à partir des solutions ci-après : tampon Tris-HCl 1,5M pH 8,8 SDS 0,4% (gel de séparation) ou tampon Tris-HCl 0,5M pH 6,8 SDS 0,4% (gel d'empilement), Bisacrylamide 30%, APS (Persulfate d'Ammonium), eau et TEME D.

Echantillons

Les échantillons préparés en présence d'une solution alourdissante contenant du β -Mercapthoéthanol sont bouillis durant trois minutes avant d'être déposés sur le gel.

Un marqueur de taille protéique "Prosize" (Color protein markers, Cambrex) est également déposé sur le gel.

Le tampon de migration est composé de Tris 250 mM, Glycine 1,92M et SDS 1%.

Transfert des protéines

Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane en PVDF (Polyvinylidène difluorure). Pour cela, le gel est mis en contact avec une membrane, le tout entre quatre feuilles de papier Watman et deux éponges. Le tout est imbibé de solution de transfert (Tris-HCl 25mM, glycine 192mM et méthanol 20%). Un courant de 250 mA avec une différence de potentiel de 8 volt est appliqué au montage.

Une solution de Rouge Ponceau (0,1% dans 5% d'acide acétique : Sigma) marque de façon réversible l'ensemble des protéines présentes et permet de visualiser la qualité du transfert.

Ensuite, les membranes sont bloquées toute la nuit dans une solution de lait en poudre 5% dans le PBS-Tween 0,1%.

Marquage avec un anticorps primaire et un anticorps secondaire

Les membranes bloquées sont lavées, puis incubées en présence de l'anticorps primaire (Hya-1 : dilution 1/2000 dans solution BSA PBST (0,1%), 1 heure d'incubation ; Lamp1 (marquage de la membrane des lysosomes) : dilution 1/ 8000 dans solution lait PBST (0,1%), 2 heures d'incubation).

Les membranes fixées avec l'anticorps primaire sont incubées avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-souris HRP (Hya-1 : dilution 1/8000 dans solution BSA PBST (0,1%), 45min. d'incubation ; Lamp1 : dilution 1/8000 dans solution lait PBST (0,1%), 1 heure d'incubation).

Enfin, après plusieurs lavages des membranes fixées, vient l'étape de la révélation.

Révélation

La visualisation des protéines reconnues par l'anticorps se fait grâce à une réaction de chemoluminescence. Le HRP catalyse la dégradation de l'eau oxygénée en eau et oxygène. L'oxygène oxyde le luminol provoquant une émission de lumière détectée sur un film photographique.

Le kit utilisé est le kit Perkin Elmer "Western Lighting Chemo luminescence" Reagent Plus.

7) Microscopie électronique à transmission

Les cellules sont fixées à la glutaraldéhyde (1,5%) dans un tampon cacodylate 0,1mol/l, pH 7,4, et à l'acide osmique (1%). La déshydratation est faite à l'éthanol et l'enrobage à l'épon; la coloration à l'acétate d'uranyle (0,5% dans l'alcool 50%) et le Reynolds (JCB 1963, 17, 208). Les fractions isolées à partir du gradient de saccharose sont centrifugées à haute vitesse. Le culot obtenu est ensuite traité de la même façon que les cellules.

8) Présentation des résultats

A. Dosages enzymatiques des fractions issues du fractionnement complet par centrifugation différentielle

Pour calculer et présenter les résultats, nous utilisons les méthodes décrites par de Duve et al. (1955). Les résultats sont portés en graphique : il s'agit d'un histogramme avec, en ordonnée, l'activité spécifique relative à savoir le rapport entre le pourcentage d'activité totale de la fraction déterminée et le pourcentage de protéines dans cette même fraction, et, en abscisse, la quantité relative de protéines des cinq fractions cumulées de gauche à droite.

Chacune de ces fractions est représentée par un rectangle dont la hauteur est proportionnelle à la purification de l'enzyme, la base est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans la fraction et la surface représente le contenu relatif en enzyme dans la fraction.

Pour les dosages enzymatiques, ainsi que pour le dosage de protéines, on calcule la récupération en sommant les valeurs d'activités enzymatiques trouvées dans les fractions N, M, L, P et S rapportées à l'activité de l'homogénat, qui équivaut à E+N.

B. Dosages enzymatiques des fractions issues d'un gradient continu en saccharose

Le mode de représentation en histogramme des résultats, utilisé pour le gradient continu de saccharose, est celui décrit par Beaufay et al. (1964). Chaque fraction est matérialisée sous la forme d'un rectangle dont : la base correspond aux limites de densité de la fraction, la hauteur représente la fréquence qui équivaut au rapport du pourcentage d'activité enzymatique sur l'incrément de densité de chacune des fractions, et la surface, quant à elle, représente la proportion d'activité enzymatique dans la fraction en question.

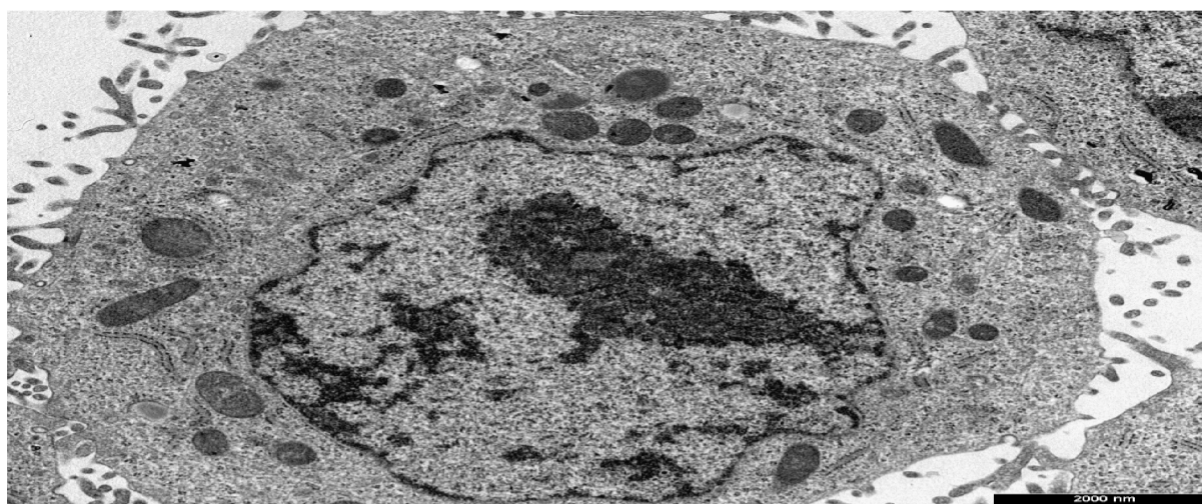
C. Western Blotting

Comme expliqué ci-haut, cette méthode est utilisée afin de détecter la présence d'une protéine dans un échantillon à l'aide d'un anticorps spécifique de cette protéine.

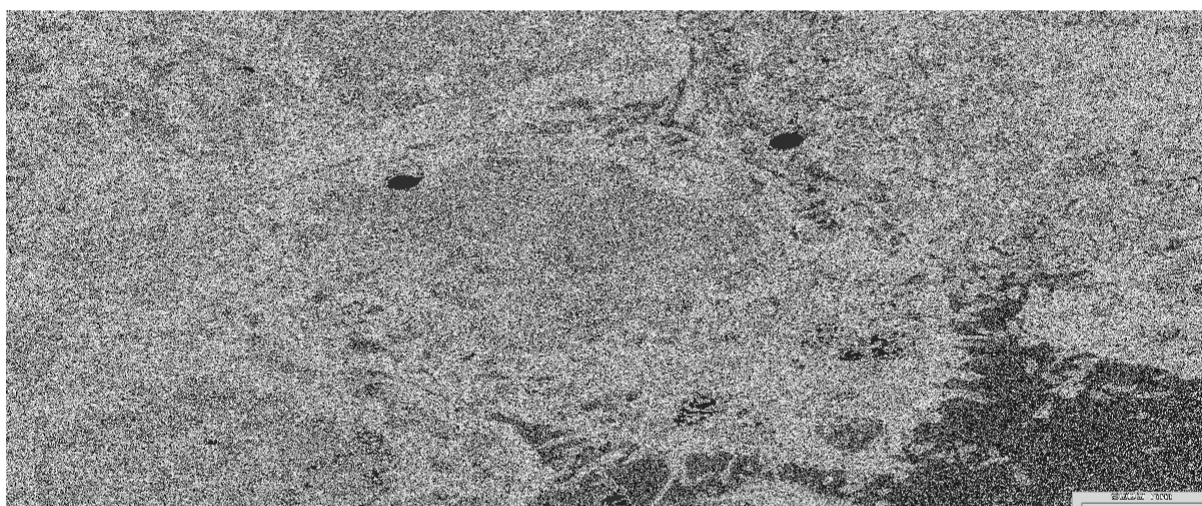
La visualisation des protéines reconnues par l'anticorps se fait grâce à une réaction de chemoluminescence. Le HRP catalyse la dégradation de l'eau oxygénée en eau et oxygène. L'oxygène oxyde le luminol provoquant une émission de lumière détectée sur film photographique.

Nous avons quantifié l'intensité de la lumière émise sur chaque bande imprimée sur le film : une bande plus intense signifie qu'elle contient une quantité plus grande de protéines (de même poids moléculaire). La distribution de la quantification de l'intensité des bandes peut être représentée sous forme de graphe de manière analogue à celle utilisée pour les activités enzymatique.

Témoin



Progestérone 24h



Progestérone 48h

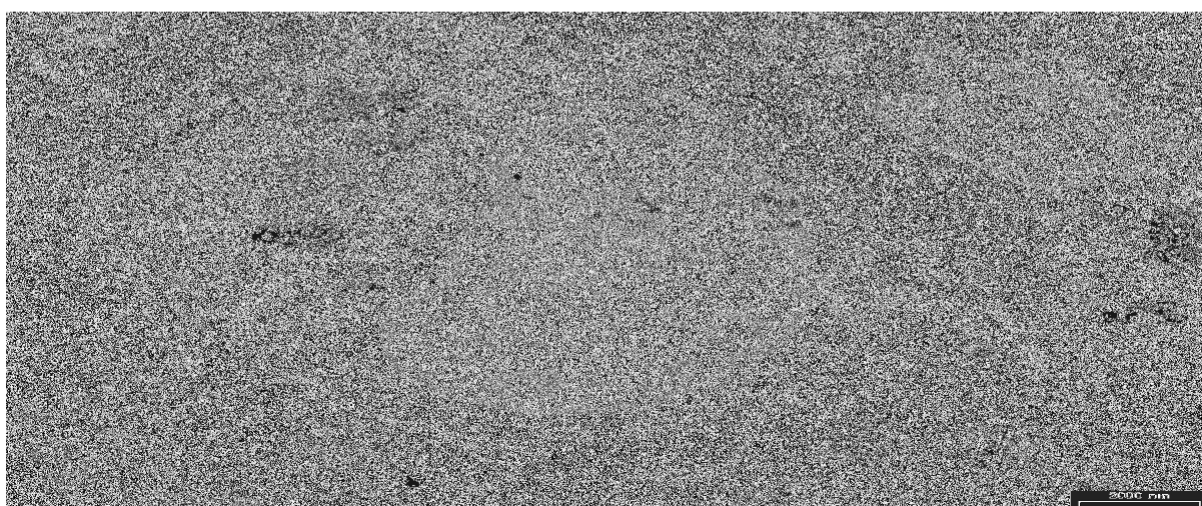
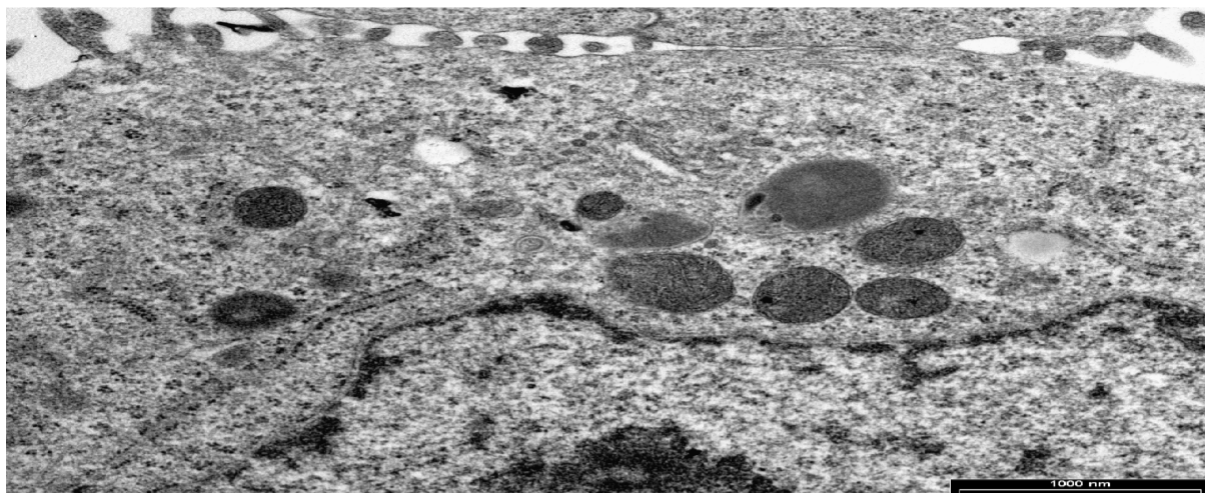
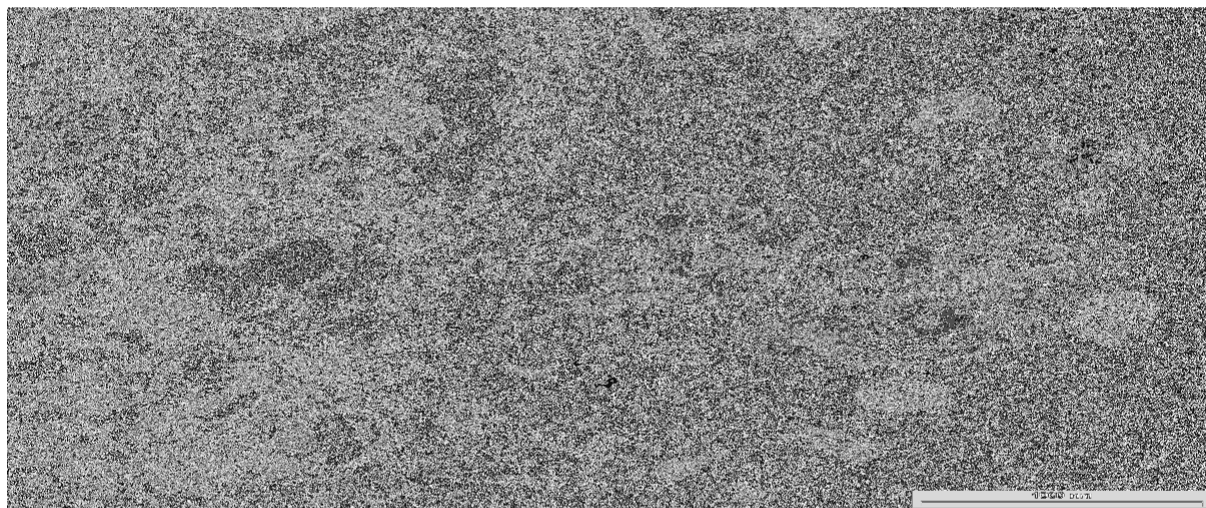


Fig. 6-1. Examen en MET (3750X) des cellules témoins et celles soumises à l'action de la progestérone (10 μ g/ml) pendant 24h et 48h, de manière à mettre en évidence d'éventuelles modifications de la structure subcellulaire sous l'effet de l'hormone.

Témoin



Progestérone 24h



Progestérone 48h



Fig. 6-2. Examen en MET (17500X) des cellules témoins et celles soumises à l'action de la progestérone (10 μ g/ml) pendant 24h et 48h, de manière à mettre en évidence d'éventuelles modifications de la structure subcellulaire sous l'effet de l'hormone.

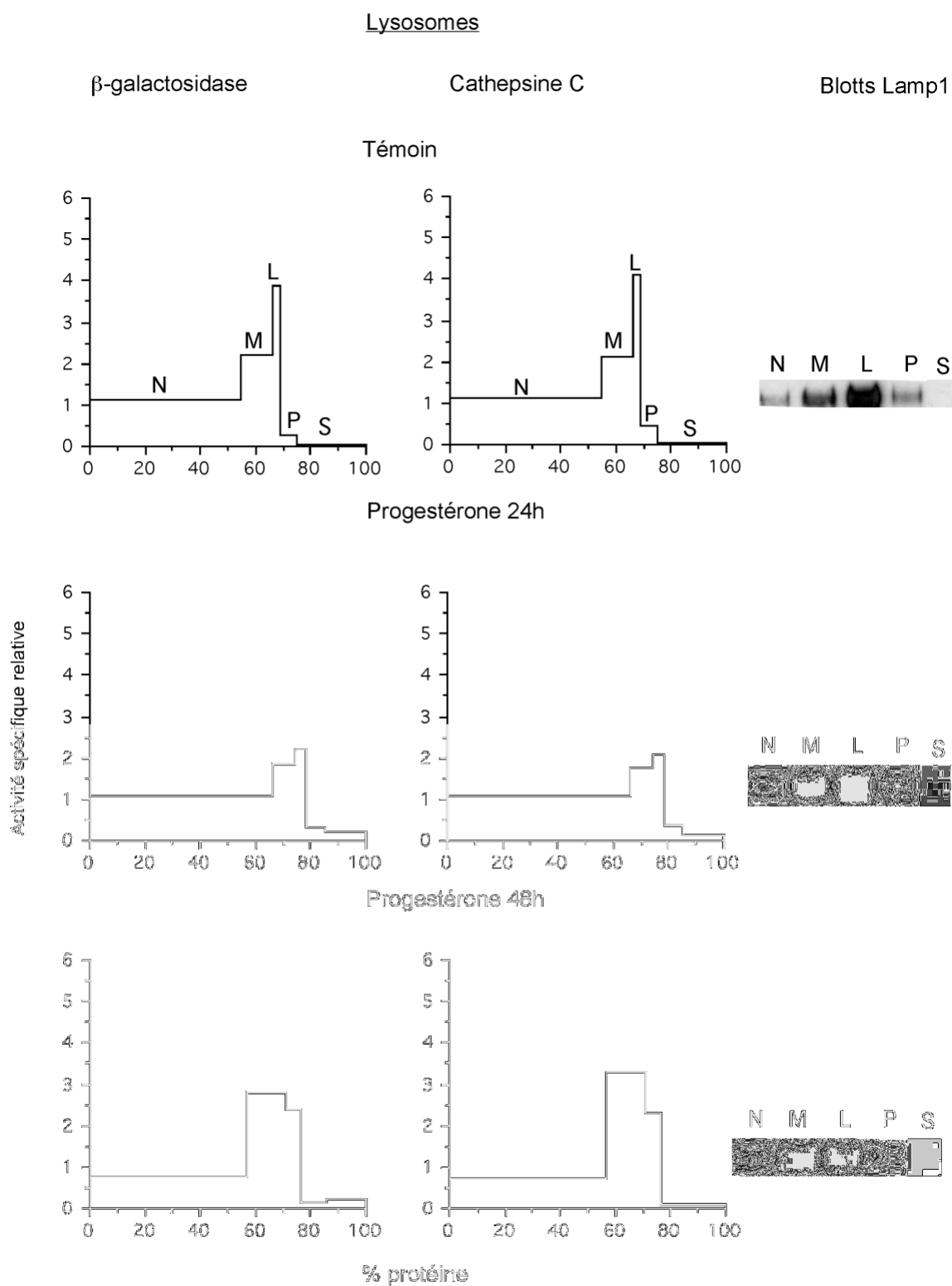


Fig. 7. Distribution intracellulaire des marqueurs enzymatiques de lysosomes (β -galactosidase, cathepsins C et lamp1) après centrifugation fractionnée d'un homogénat. Celui-ci est centrifugé à des vitesses de plus en plus élevées de façon à obtenir quatre fractions: N, M, L et P qui contiennent des organites de plus en plus petits ainsi que la fraction S qui renferme les éléments non sédimentables de la cellule. En ordonnée, est notée l'activité spécifique relative à savoir le rapport entre le pourcentage d'activité totale de la fraction déterminée et le pourcentage de protéines dans cette même fraction, et, en abscisse, la quantité relative de protéines des cinq fractions cumulée de gauche à droite. Chacune de ces fractions est représentée par un rectangle dont la hauteur est proportionnelle à la purification de l'enzyme, la base est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans la fraction et la surface représente le contenu relatif en enzyme dans la fraction.

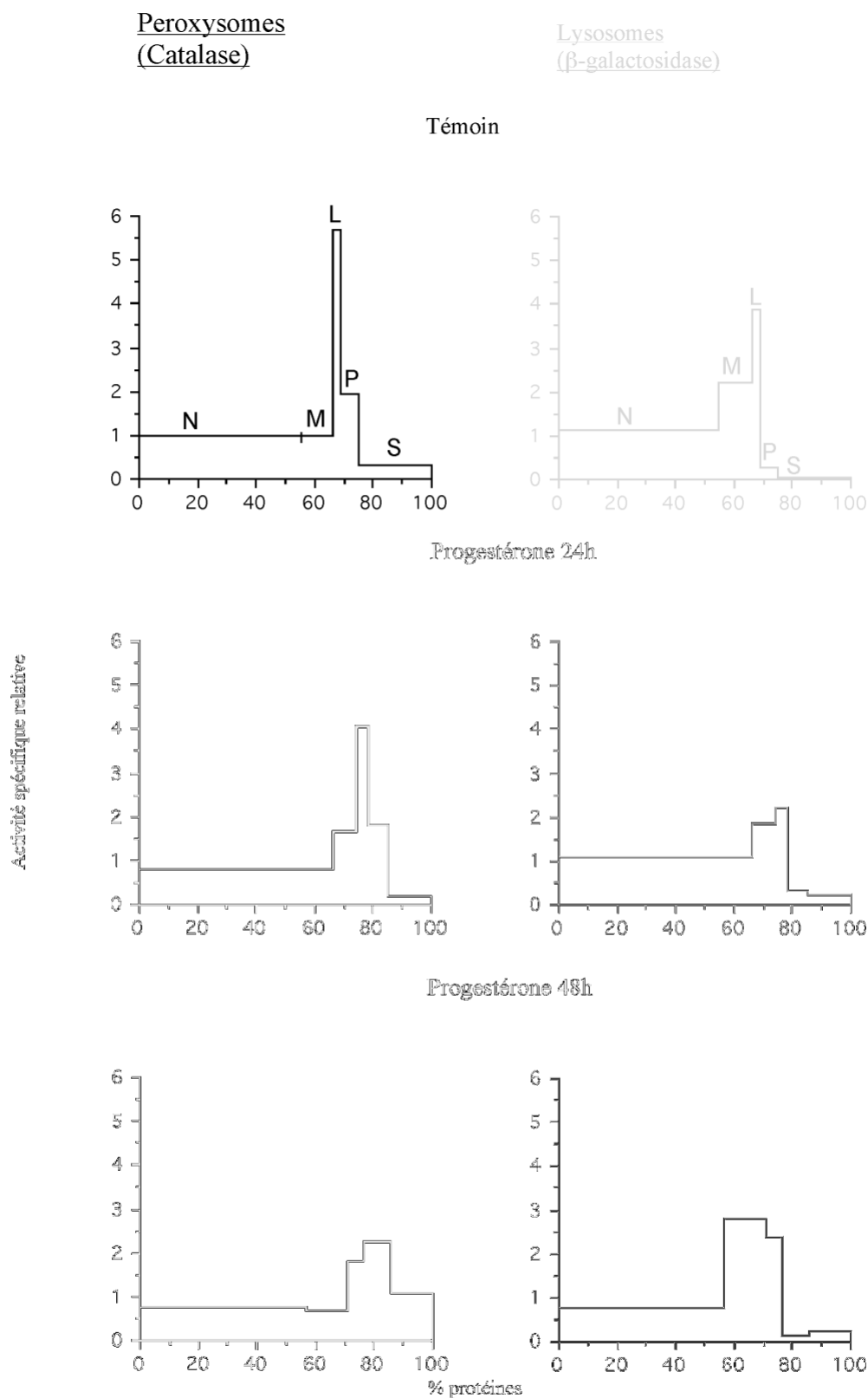


Fig. 8. Distribution intracellulaire d'un marqueur enzymatique de peroxyosomes après centrifugation fractionnée d'un homogénat. Celui-ci est centrifugé à des vitesses de plus en plus élevées de façon à obtenir quatre fractions: N, M, L et P qui contiennent des organites de plus en plus petits ainsi que la fraction S qui renferme les éléments non sédimentables de la cellule. En ordonnée, est notée l'activité spécifique relative à savoir le rapport entre le pourcentage d'activité totale de la fraction déterminée et le pourcentage de protéines dans cette même fraction, et, en abscisse, la quantité relative de protéines des cinq fractions cumulées de gauche à droite. Chacune de ces fractions est représentée par un rectangle dont la hauteur est proportionnelle à la purification de l'enzyme, la base est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans la fraction et la surface représente le contenu relatif en enzyme dans la fraction.

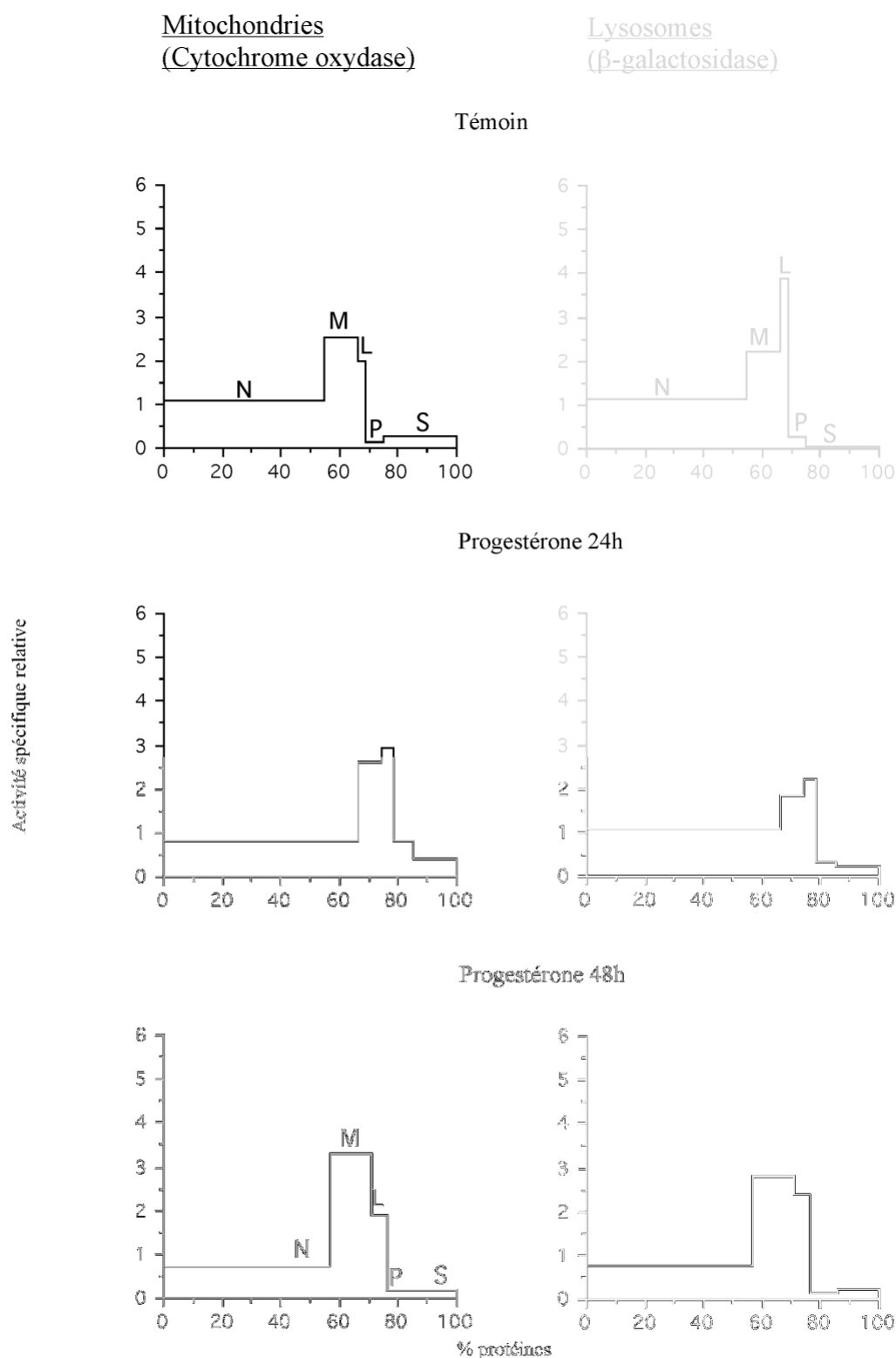


Fig. 9. Distribution intracellulaire d'un marqueur enzymatique de mitochondries après centrifugation fractionnée d'un homogénat. Celui-ci est centrifugé à des vitesses de plus en plus élevées de façon à obtenir quatre fractions: N, M, L et P qui contiennent des organites de plus en plus petits ainsi que la fraction S qui renferme les éléments non sédimentables de la cellule. En ordonnée, est notée l'activité spécifique relative à savoir le rapport entre le pourcentage d'activité totale de la fraction déterminée et le pourcentage de protéines dans cette même fraction, et, en abscisse, la quantité relative de protéines des cinq fractions cumulée de gauche à droite. Chacune de ces fractions est représentée par un rectangle dont la hauteur est proportionnelle à la purification de l'enzyme, la base est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans la fraction et la surface représente le contenu relatif en enzyme dans la fraction.

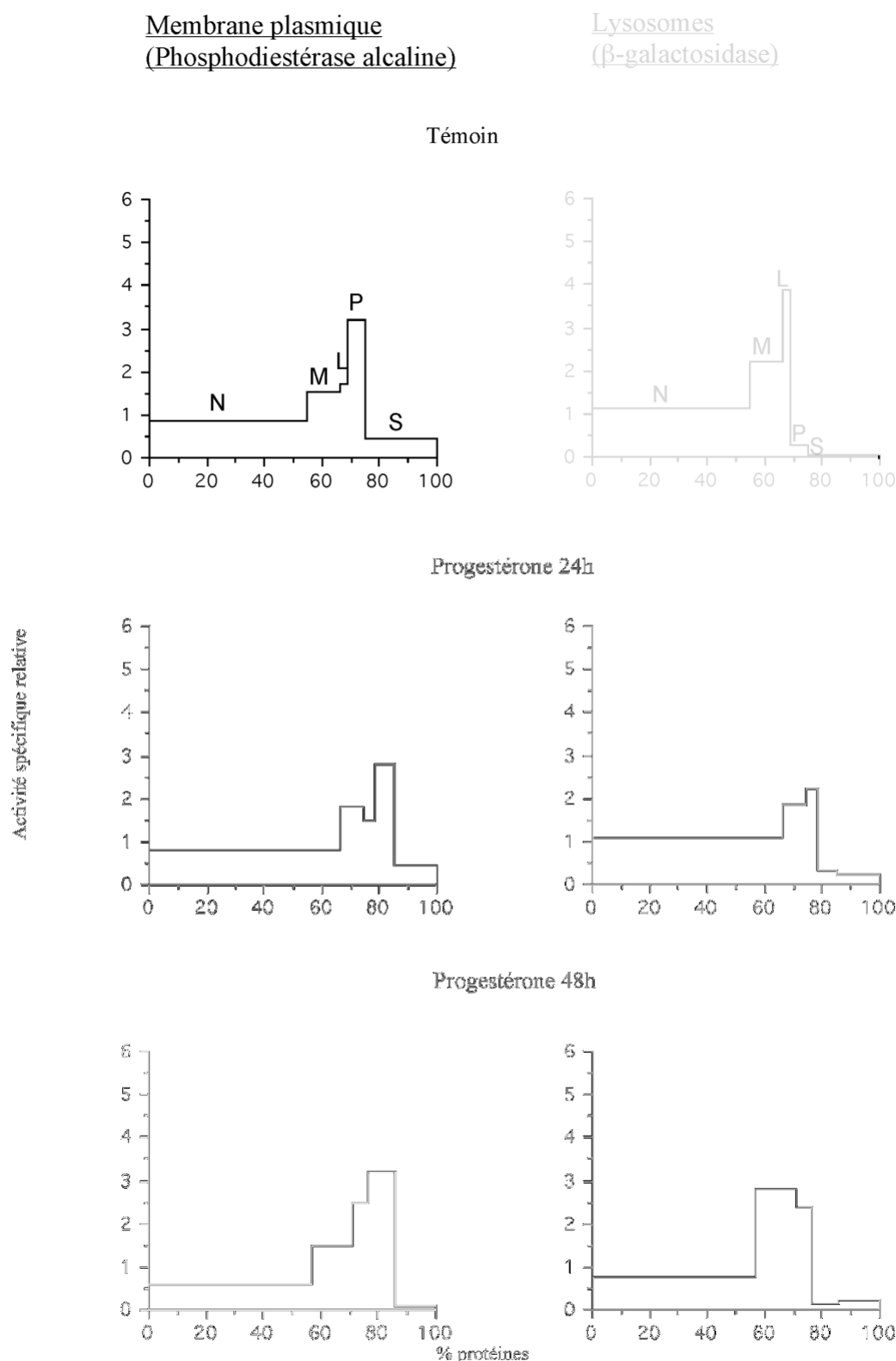
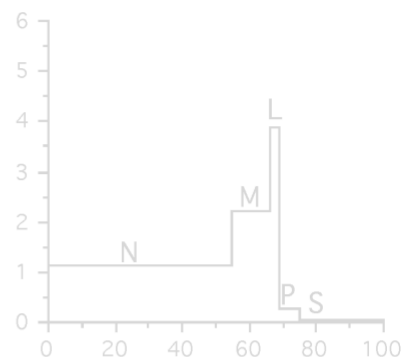
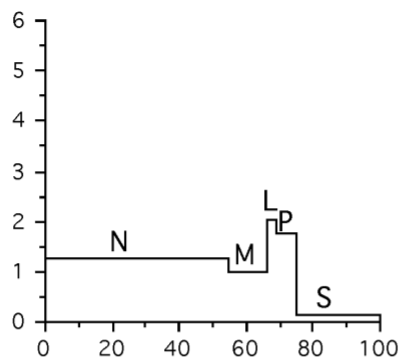


Fig. 10. Distribution intracellulaire d'un marqueur enzymatique de la membrane plasmique après centrifugation fractionnée d'un homogénat. Celui-ci est centrifugé à des vitesses de plus en plus élevées de façon à obtenir quatre fractions: N, M, L et P qui contiennent des organites de plus en plus petits ainsi que la fraction S qui renferme les éléments non sédimentables de la cellule. En ordonnée, est notée l'activité spécifique relative à savoir le rapport entre le pourcentage d'activité totale de la fraction déterminée et le pourcentage de protéines dans cette même fraction, et, en abscisse, la quantité relative de protéines des cinq fractions cumulée de gauche à droite. Chacune de ces fractions est représentée par un rectangle dont la hauteur est proportionnelle à la purification de l'enzyme, la base est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans la fraction et la surface représente le contenu relatif en enzyme dans la fraction.

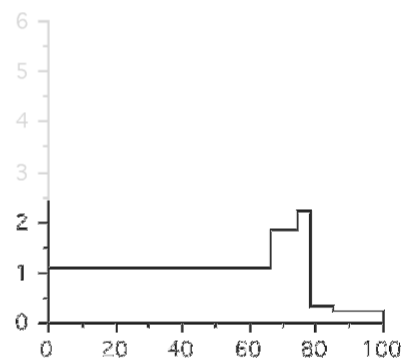
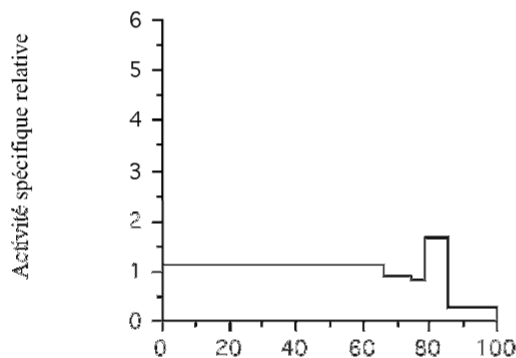
Réticulum endoplasmique
(a-glucosidase alcaline)

Lysosomes
(b-galactosidase)

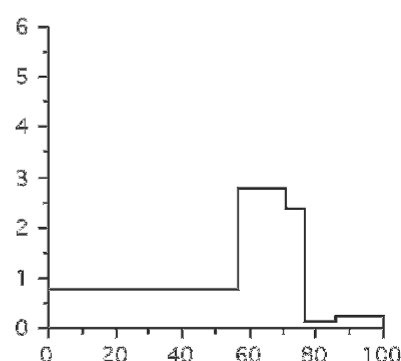
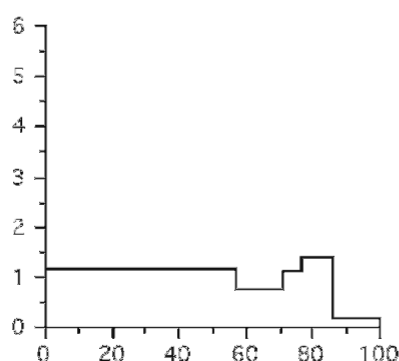
Témoin



Progestérone 24h



Progestérone 48h



% protéines

Fig. 11. Distribution intracellulaire d'un marqueur enzymatique de réticulum endoplasmique après centrifugation fractionnée d'un homogénat. Celui-ci est centrifugé à des vitesses de plus en plus élevées de façon à obtenir quatre fractions: N, M, L et P qui contiennent des organites de plus en plus petits ainsi que la fraction S qui renferme les éléments non sédimentables de la cellule. En ordonnée, est notée l'activité spécifique relative à savoir le rapport entre le pourcentage d'activité totale de la fraction déterminée et le pourcentage de protéines dans cette même fraction, et, en abscisse, la quantité relative de protéines des cinq fractions cumulées de gauche à droite. Chacune de ces fractions est représentée par un rectangle dont la hauteur est proportionnelle à la purification de l'enzyme, la base est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans la fraction et la surface représente le contenu relatif en enzyme dans la fraction.

Distribution intracellulaire de différents marqueurs enzymatiques lysosomiaux après centrifugation différentielle d'un homogénat d'HepG2.

Cellules HepG2		% N	% M	% L	% P	% S	Récup. (% de E+N)
Protéines	Témoin	55,05	11,06	2,80	6,37	24,72	97,50
	Progest.24h	66,01	8,17	4,02	7,16	14,63	104,93
	Progest.48h	56,89	13,85	5,39	9,55	14,31	92,13
Lysosomes β-galactosidase	Témoin	61,14	24,65	10,91	1,75	1,56	97
	Progest.24h	70,60	15,14	8,81	2,19	3,27	94
	Progest.48h	43,68	38,76	12,86	1,39	3,31	88
Cathépsine C	Témoin	61,44	23,63	11,52	2,72	0,69	96
	Progest.24h	72,53	14,47	8,27	2,71	2,02	90
	Progest.48h	39,71	45,84	12,40	0,84	1,22	107
Lamp1	Témoin	46,84	31,51	15,64	6,01	0	109
	Progest.24h	57,82	18,51	12,40	11,26	0	105
	Progest.48h	34,58	45,85	17,63	1,94	0	131

III) **Résultats et discussion**

1) **Effet de la progestérone sur les cellules HepG2**

A. Etude morphologique : Microscopie électronique à transmission (MET)

Nous avons examiné, en MET les cellules témoins et celles soumises à l'action de la progestérone (10µg/ml) pendant 24h et 48h, de manière à mettre en évidence d'éventuelles modifications de la structure subcellulaire sous l'effet de l'hormone. Les figures 6-1 et 6-2 montrent qu'après 24h d'action de la progestérone apparaissent de grandes vacuoles de structures complexes, présentant de nombreuses zones claires et supposées comme étant des lysosomes surchargés en cholestérol. Ces structures sont tout à fait comparables à celles décrites chez les souris NCTR-Balb/c (Manford et al. 1982), dans les neurones des souris NPC1-/- (Liu et al 2000) et, par comparaison à ces derniers, dans les cellules des patients souffrant de la maladie Niemann-Pick type C (Liu et al 2000). Après 48h d'action de la progestérone, les mêmes structures se retrouvent, mais de taille plus grande. Nous pouvons voir par contre distinctement que les cellules témoins contiennent des lysosomes classiques denses. L'apparition des vacuoles surchargées serait la seule perturbation induite par le traitement. Les autres compartiments subcellulaires ne semblent pas montrer de modifications.

B. Distribution des enzymes de référence après centrifugation fractionnée de l'homogénat

Dans le but d'observer les éventuelles perturbations induites par la progestérone sur la distribution intracellulaire de différents marqueurs enzymatiques, nous avons comparé les distributions obtenues à partir du fractionnement des cellules témoins et des cellules traitées 24 h ou 48 h par la progestérone (10µg/ml). Les résultats sont repris aux figures 7 à 11 et au tableau 2 : la β -galactosidase et la cathepsine C, marqueurs de la matrice lysosomale, présentent l'activité spécifique relative (ASR) ou purification la plus élevée dans la fraction L des cellules témoins. Après 24 h d'action de la progestérone, l'ASR de la fraction L diminue et après 48 h, c'est la fraction M qui présente l'ASR la plus élevée. Notons parallèlement que l'ASR dans N baisse légèrement après 24h et fortement après 48h. L'ASR baisse dans la fraction L, mais augmente dans la fraction M après 24h d'action de la progestérone. L'ASR étant le rapport entre le pourcentage d'activité totale et le pourcentage de protéines dans une fraction, la diminution d'ASR dans la fraction L et l'augmentation d'ASR dans la fraction M s'expliquent, respectivement, par le pourcentage de protéine plus grand dans la fraction L, mais plus petit dans la fraction M par rapport au témoin (cfr tableau

2). La distribution de la protéine Lamp1, marqueur de la membrane lysosomale, mise en évidence par immunoblotting, montre la même évolution que les enzymes lysosomales solubles (Fig. 7). Vu que l'expérience ne s'est effectuée qu'une seule fois, cette interprétation doit cependant être avancée avec prudence. La catalase marqueur des peroxysomes, présente l'ASR la plus élevée dans la fraction L, tant chez les cellules témoins qu'après 24h d'action de la progestérone. Par contre, c'est la fraction P qui présente la meilleure purification après 48h d'action de la progestérone, suggérant que la taille des peroxysomes serait dans ce cas réduite (Fig. 8). La cytochrome-oxydase des mitochondries se trouve principalement dans les fractions M et L quel que soit le type de cellules (Fig. 9). La répartition du réticulum endoplasmique, représenté par l' α -glucosidase alcaline ne montre pas de purification importante dans aucune des fractions. Les distributions légèrement variables d'un type de cellules à l'autre ne semblent pas indiquer de différence significative (Fig. 10). La phosphodiesterase alcaline, marqueur de la membrane plasmique, montre l'ASR la plus élevée dans la fraction P dans les trois types de cellules (Fig. 11).

Hormis pour les lysosomes, nous n'observons pas de différences majeures dans les répartitions des différents organites au sein des fractions N, M, L, P et S.

Le glissement des lysosomes vers la fraction M peut peut-être s'expliquer par le fait que les lysosomes sont devenus plus légers (passage des lysosomes de la fraction N vers M) et plus gros (passage des lysosomes de la fraction L vers M) sous l'effet de la surcharge en cholestérol induite par la progestérone, comme le montrent nos observations morphologiques. Mais, ces interprétations devraient être vérifiées en multipliant le nombre d'expériences et en procédant à des analyses statistiques.

Nous avons mesuré, pour les cellules 24h et 48h d'action de la progestérone, l'activité spécifique de marqueurs de lysosome exprimée en pourcent de celle des témoins (résultats non montrés). L'activité spécifique de la β -galactosidase des lysosomes augmente après 24h d'action progestérone (132%) et plus encore après 48h (337%). Notons que la forte augmentation de l'activité spécifique de la β -galactosidase est comparable à celle décrite pour la N-acétylglucosaminidase et la β -glucuronidase chez les souris NCTR BALB/c (Bhuvanes Waram et al. 1982).

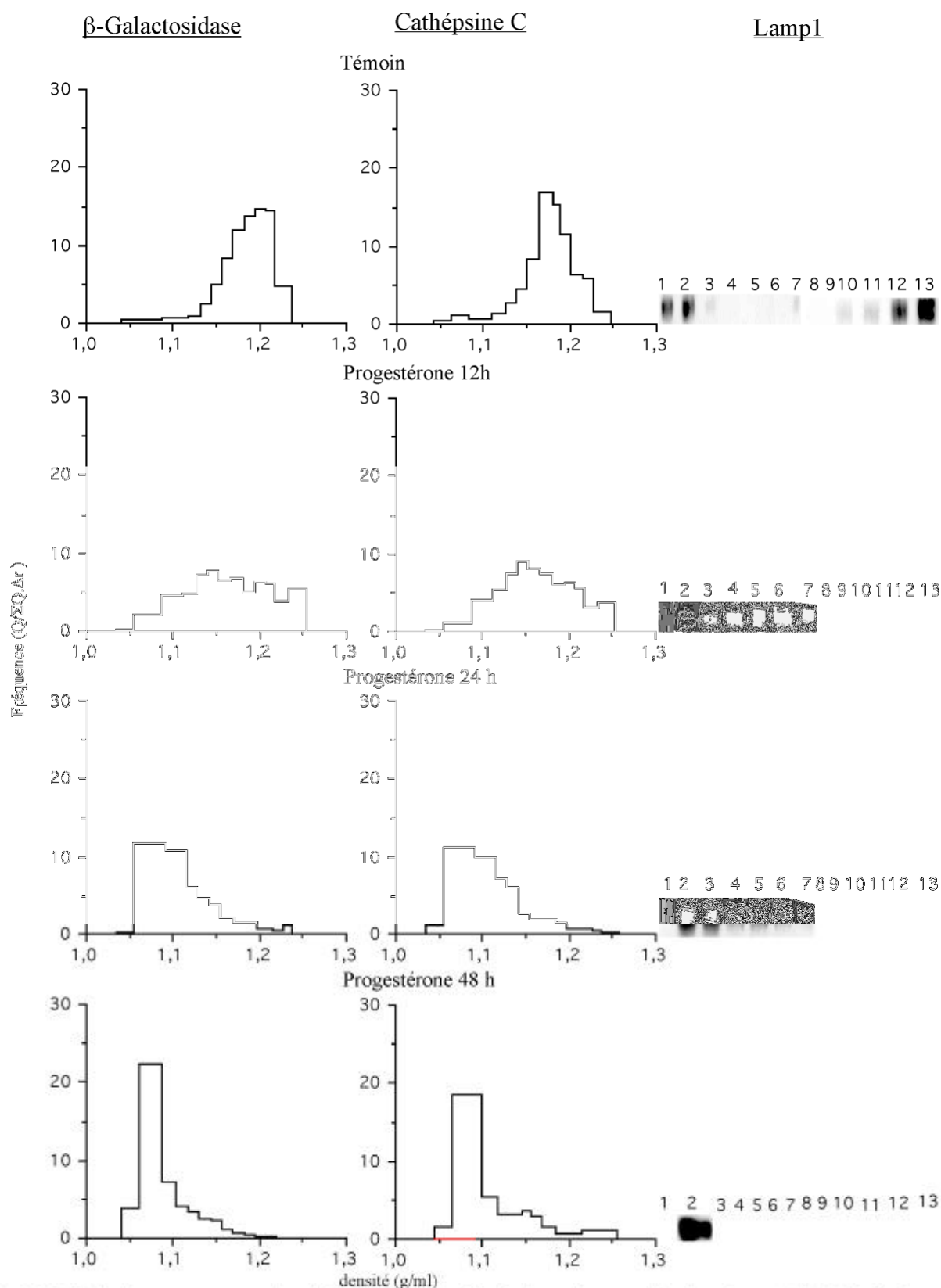


Fig. 12. Distribution des marqueurs enzymatiques de lysosomes après centrifugation isopycnique en gradient de saccharose (1,09-1,26) des fractions post nucléaires sédimentables (MLP). En centrifugation isopycnique, les particules sont centrifugées dans un gradient de densité jusqu'à ce qu'elles occupent la position correspondant à leur densité d'équilibre ; à ce moment leur vitesse de sédimentation est devenue nulle. En ordonnée, est notée la fréquence qui équivaut au rapport du pourcentage d'activité enzymatique sur l'incrément de densité de chacune des fractions, en abscisse, les limites de densité de chaque fraction.

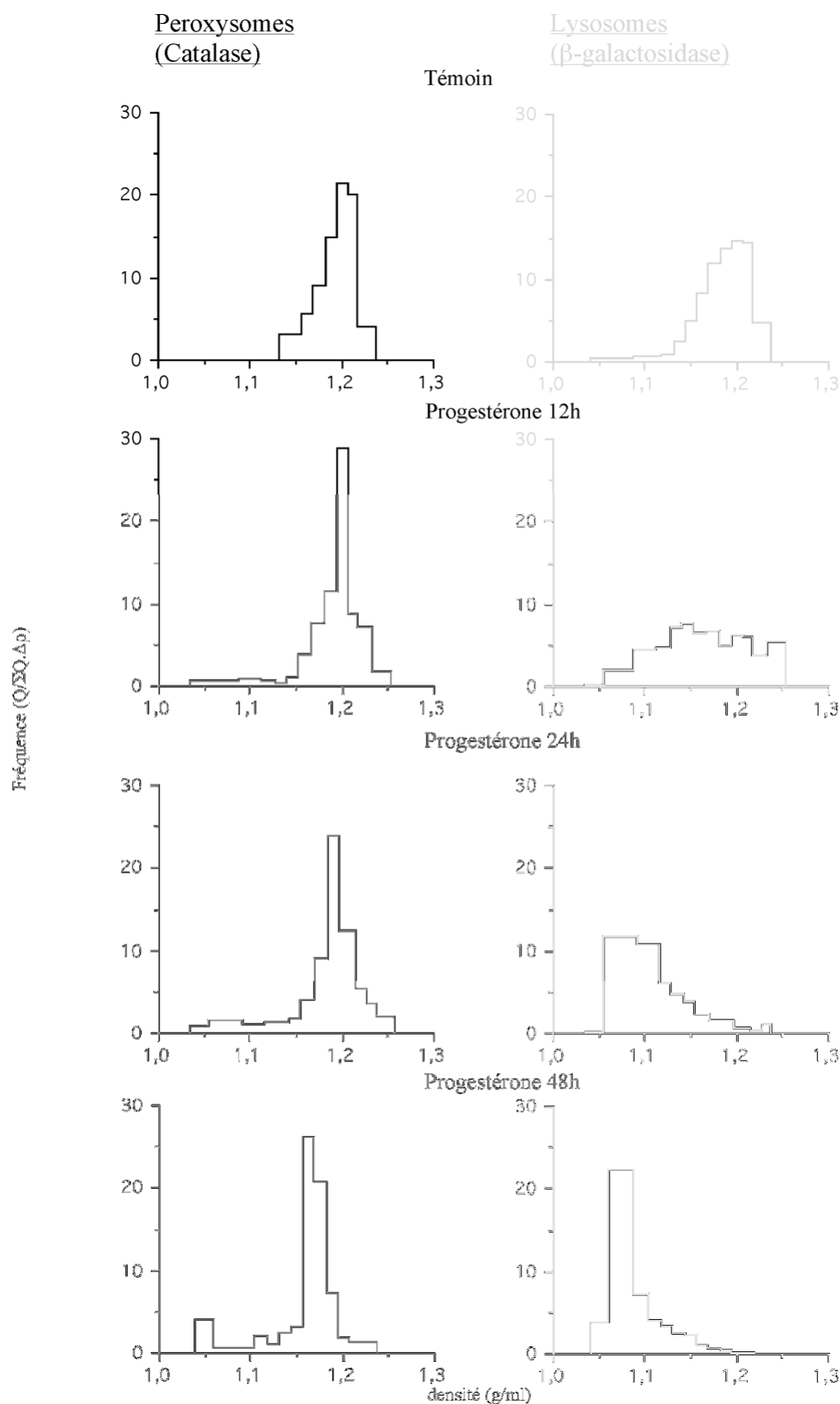


Fig. 13. Distribution des marqueurs enzymatiques de peroxysomes après centrifugation isopycnique en gradient de saccharose (1,09-1,26) des fractions post nucléaires sédimentables (MLP). En centrifugation isopycnique, les perisomes sont centrifugés dans un gradient de densité jusqu'à ce qu'ils occupent la position correspondant à leur densité d'équilibre ; à ce moment leur vitesse de sédimentation est devenue nulle. En conséquence, est notée la fréquence qui équivaut au rapport du pourcentage d'activité enzymatique sur l'incrément de densité de chacune

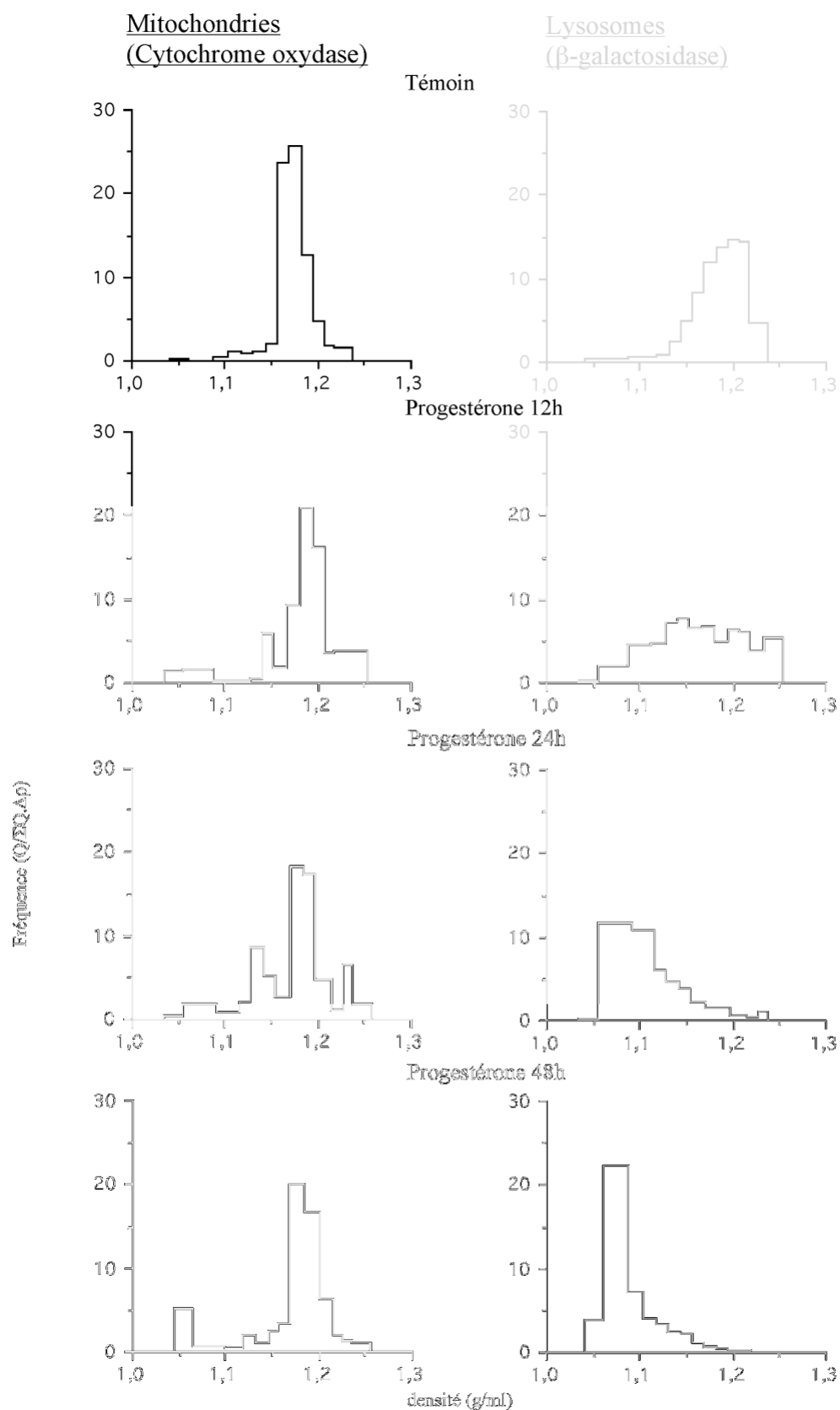


Fig. 14. Distribution des marqueurs enzymatiques de mitochondries après centrifugation isopycnique en gradient de saccharose (1,09-1,26) des fractions post nucléaires sédimentables (MLP). En centrifugation isopycnique, les particules sont centrifugées dans un gradient de densité jusqu'à ce qu'elles occupent la position correspondant à leur densité d'équilibre ; à ce moment leur vitesse de sédimentation est devenue nulle. En ordonnée, est notée la fréquence qui équivaut au rapport du pourcentage d'activité enzymatique sur l'intervenant de densité de chacune des fractions, en abscisse, les boîtes de densité de chaque fraction.

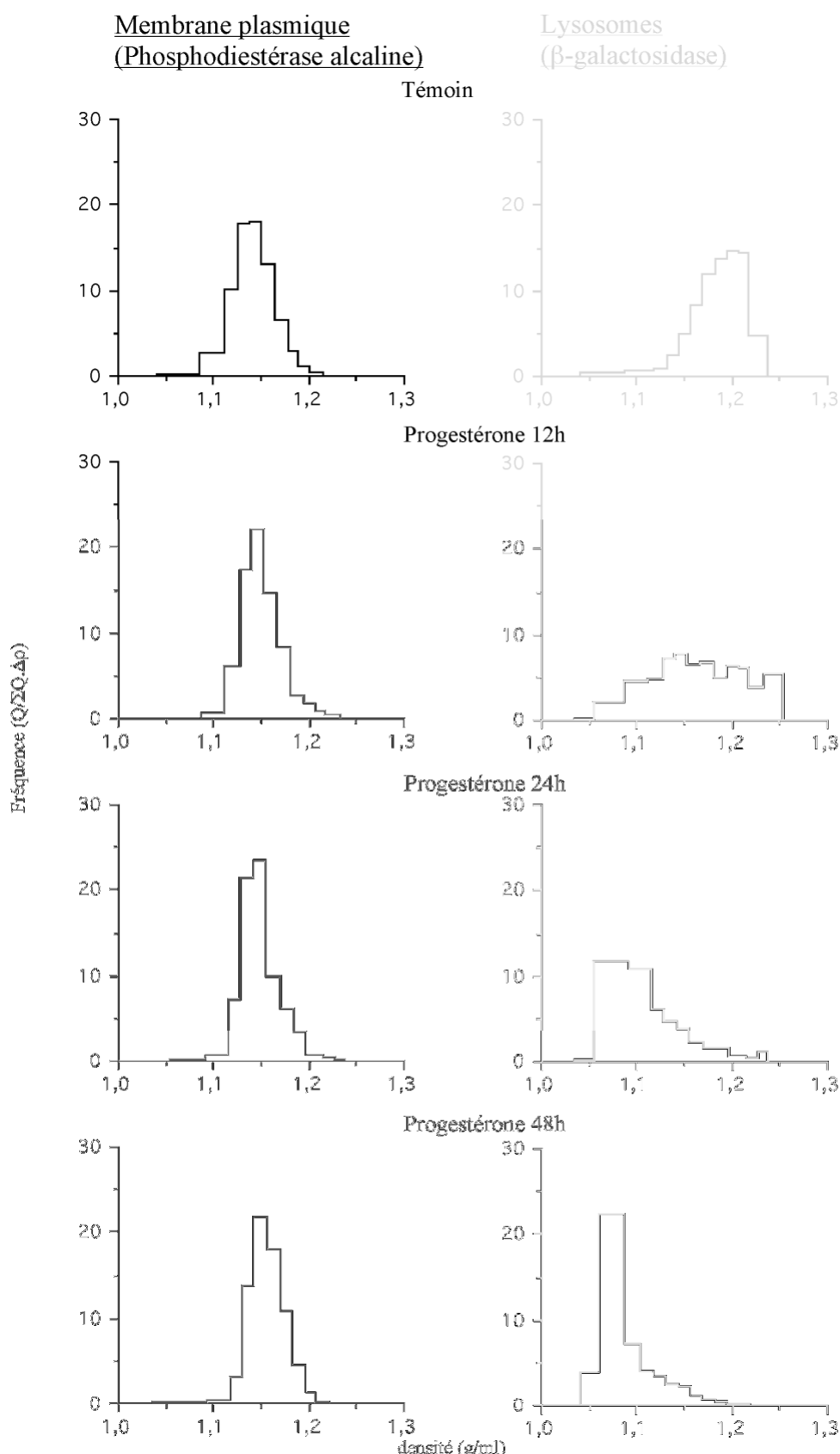


Fig.15. Distribution des marqueurs enzymatiques de membrane plasmique après centrifugation isopycnique en gradient de saccharose (1,09-1,26) des fractions post nucléaires sédimentables (MLP). En centrifugation isopycnique, les particules sont centrifugées dans un gradient de densité jusqu'à ce qu'elles occupent la position correspondant à leur densité d'équilibre ; à ce moment leur vitesse de sédimentation est devenue nulle. En ordonnée, est notée la fréquence qui équivaut au rapport du pourcentage d'activité enzymatique sur l'incrément de densité chacune des fractions, en abscisse, les limites de densité de chaque fraction.

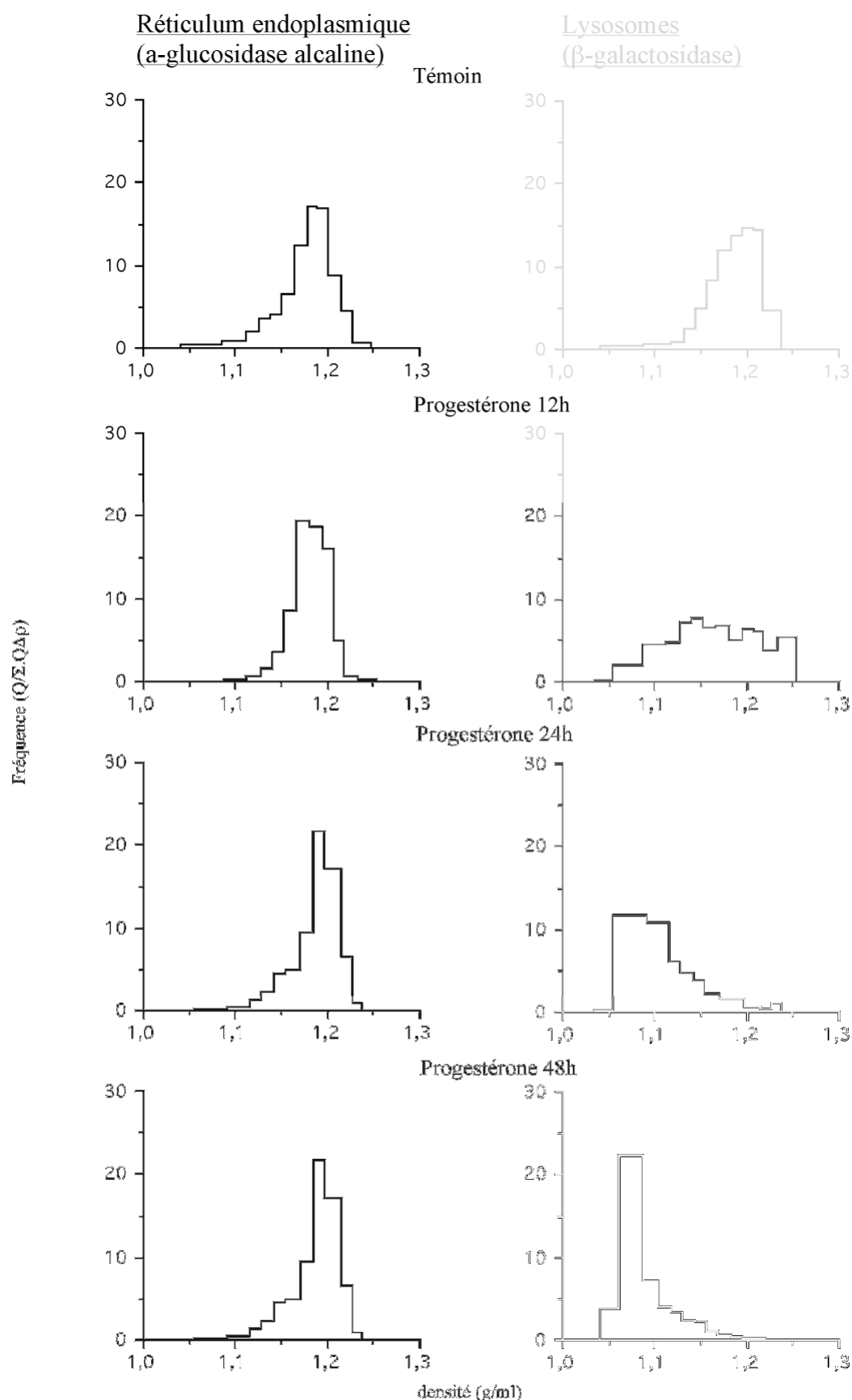


Fig. 16. Distribution des marqueurs enzymatiques de réticulum endoplasmique après centrifugation isopycnique en gradient de saccharose (1,09-1,26) des fractions post nucléaires sédimentables (MLP). En centrifugation isopycnique, les particules sont centrifugées dans un gradient de densité jusqu'à ce qu'elles occupent la position correspondant à leur densité d'équilibre ; à ce moment leur vitesse de sédimentation est devenue nulle. En ordonnée, est notée la fréquence qui équivaut au rapport du pourcentage d'activité enzymatique sur l'inversement de densité de chacune des fractions, en abscisse, les limites de densité de chaque fraction.

Enzymes	Témoin	progestérone 12h	progestérone 24h	progestérone 48h
β-galactosidase	1,19	1,16	1,10	1,08
Cathepsine C	1,18	1,16	1,10	1,09
Lamp1	1,22	1,14	1,10	1,07
Catalase	1,20	1,20	1,19	1,18
Cytochrome Oxydase	1,17	1,19	1,18	1,17
α-glucosidase alcaline	1,18	1,18	1,19	1,19
Phosphodiesterase alcaline	1,14	1,15	1,15	1,15

Tableau 3 : Densités d'équilibre (g/ml) des marqueurs enzymatiques d'organites subcellulaires après centrifugation isopycnique en gradient de saccharose (1,09-1,26) des fractions post nucléaires sédimentables (MLP)

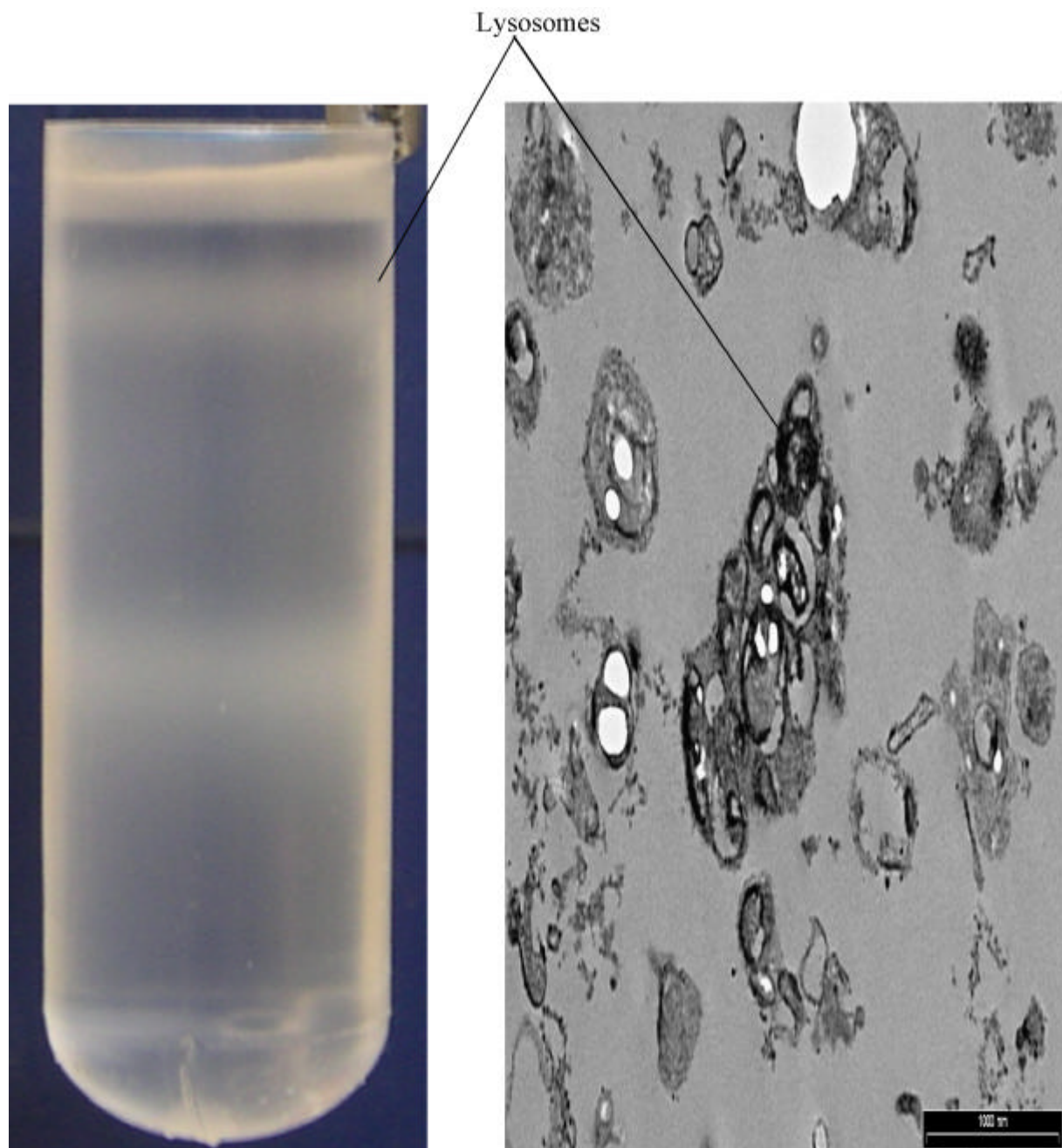


Fig. 17. Fraction lysosomale isolée après centrifugation isopycnique en gradient de saccharose (1,09-1,26) d'une fraction post nucléaire sédimentable (MLP). A. Aspect d'un gradient de saccharose après centrifugation isopycnique d'une fraction MLP obtenue à partir de cellules traitées 24h par la progestérone. La bande opalescente située au sommet du tube contient l'essentiel des hydrolases lysosomales et de la protéine Lamp1. Elle contient donc des lysosomes allégés. B. La fraction contenant les lysosomes laisse apparaître des structures identiques à celles des cellules ayant subi l'action de la progestérone 24h ou 48 h. D'autres vésicules de toutes tailles coexistent dans cette fraction.

C. Distribution des marqueurs enzymatiques après centrifugation isopycnique en gradient de saccharose des fractions post nucléaires sédimentables (MLP)

Pour examiner plus précisément les effets de la progestérone sur les différents compartiments subcellulaires, nous avons soumis les fractions MLP des cellules témoins et des cellules traitées 12h, 24h, et 48h par la progestérone à des centrifugations isopycniques. Les résultats sont présentés aux figures 12 à 16 et au tableau 3.

On constate (Fig. 12) que les distributions des enzymes lysosomales β -galactosidase et cathepsine C subissent un déplacement progressif de leur densité d'équilibre vers les zones légères du gradient. La densité d'équilibre de la β -galactosidase par exemple passe de 1,19 g/ml chez les cellules témoins à 1,08 g/ml après 48h d'action de la progestérone. La mise en évidence de la distribution de la protéine Lamp1, par immunoblotting, montre également un déplacement vers les zones légères du gradient sous l'effet de la progestérone. La distribution de la catalase des peroxysomes montre un très léger déplacement de la densité d'équilibre vers des zones plus légères du gradient après action de la progestérone (Fig. 13). Il en est de même pour la cytochrome-oxydase des mitochondries (Fig. 14). Les distributions de l' α -glucosidase alcaline du réticulum endoplasmique et de la phosphodiesterase alcaline de la membrane plasmique ne présentent pas de variations significatives sous l'effet de la progestérone (Fig. 15 et 16).

L'ensemble de ces expériences met en évidence : un allègement progressif des lysosomes sous l'effet de la progestérone qui déjà après 24h d'action devient très important. Notons ici qu'un déplacement similaire de la densité des lysosomes a été décrit sur des fibroblastes humains traités 44h par le stéroïde U18666A (Butler et al. 1992), ainsi qu'après fractionnement subcellulaire dans un gradient de Percoll des mutants fibroblastiques NPC1 humains où un déplacement de l'activité de la β -hexosaminidase d'une fraction lysosomale lourde à une fraction lysosomale légère est mis en évidence (Pentchev et al. 1987).

D. Examen morphologique

La figure 17 montre l'aspect d'un gradient de saccharose après centrifugation isopycnique d'une fraction MLP obtenue à partir de cellules traitées 24h par la progestérone. La bande opalescente située au sommet du tube contient l'essentiel des hydrolases lysosomales et de la protéine Lamp1. Elle contient donc des lysosomes allégés.

Ce matériel a été examiné en MET (Fig. 17) et on constate que la fraction contenant des lysosomes laisse apparaître des structures identiques à celles des cellules HepG2 ayant subi l'action de la progestérone 24h ou 48 h, des cellules des souris NCTR BALB/c (Waram et al. 1982), des cellules des patients NPC (Liu et al. 2000) et des neurones des souris NPC1-/-

(Liu et al. 2000). D'autres vésicules de toutes tailles coexistent dans cette fraction. Des structures similaires ont été également décrites dans la fraction contenant les lysosomes à faible densité isolés à partir de souris NCTR BALB/c (Waram et al. 1982).

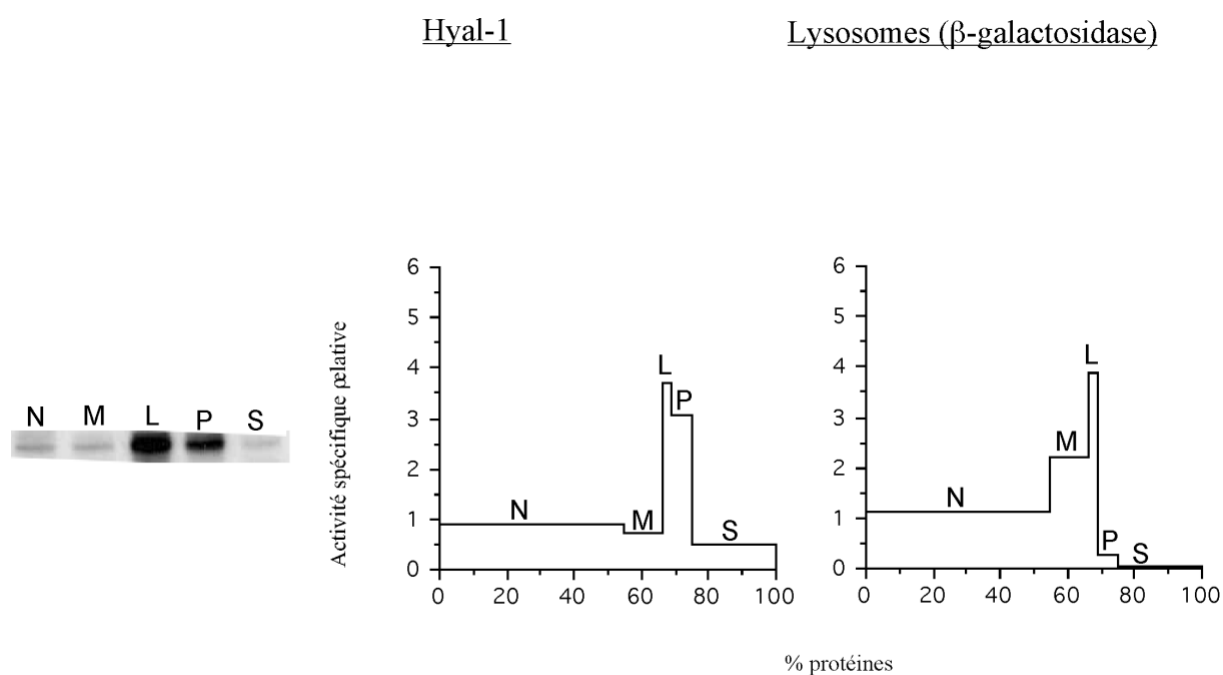


Fig. 18. Distribution intracellulaire de Hyal-1 après centrifugation fractionnée d'un homogénat. La mise en évidence d'Hyal-1 s'est réalisée par détection immunologique utilisant un anticorps monoclonal contre une forme recombinante de la protéine Hyal-1. L'intensité des bandes est proportionnelle à la quantité d'Hyal-1. La distribution de la quantification de l'intensité des bandes peut être représentée sous forme de graphe de manière analogue à celles utilisées pour les activités enzymatique.

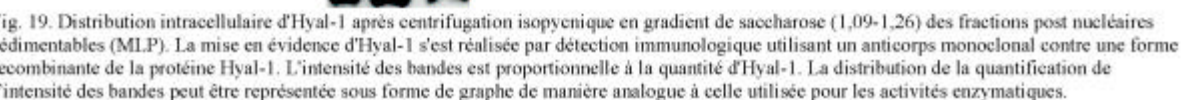


Fig. 19. Distribution intracellulaire d'Hyal-1 après centrifugation isopycnique en gradient de saccharose (1,09-1,26) des fractions post nucléaires sédimentables (MLP). La mise en évidence d'Hyal-1 s'est réalisée par détection immunologique utilisant un anticorps monoclonal contre une forme recombinante de la protéine Hyal-1. L'intensité des bandes est proportionnelle à la quantité d'Hyal-1. La distribution de la quantification de l'intensité des bandes peut être représentée sous forme de graphe de manière analogue à celle utilisée pour les activités enzymatiques.

2) Localisation intracellulaire de l'hyaluronidase-1

Pour mettre en évidence cette protéine, nous avons fait appel à la méthode de «Western-Blotting» à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine Hyal-1 (don du Dr.B. Triggs-Raine).

A. Distribution de l'hyaluronidase-1 après centrifugation fractionnée de l'homogénat

Nous avons comparé la répartition intracellulaire d'Hyal-1 à celle des lysosomes.

Pour la mise en évidence d'Hyal-1, des quantités égales de protéines de chaque fraction ont été chargées sur un gel et soumises à un Western Blotting. L'intensité des bandes est donc comparable à l'activité spécifique relative (ASR). Après quantification des signaux, les résultats ont été portés en graphique selon le même principe que pour les dosages enzymatiques.

La figure 18 montre pour Hyal-1 des activités spécifiques relatives les plus élevées dans les fractions L et P.

Le profil de la distribution d'Hyal-1 ne ressemble pas à celui de la β -galactosidase acide, mais ne s'en distingue pas suffisamment que pour pouvoir conclure quant à sa localisation lysosomale ou non lysosomale.

B. Distribution d'hyal-1 après centrifugation isopycnique en gradient de saccharose des fractions post nucléaires sédimentables (MLP)

Les résultats sont présentés à la figure 19 et au tableau 4.

L'analyse des gradients obtenus à partir des cellules témoins montrent des distributions d'Hyal-1 et de β -galactosidase qui se chevauchent. La distinction entre les structures abritant Hyal-1 et les lysosomes n'est pas possible. Un allègement sélectif de la densité des lysosomes est donc indispensable pour permettre de localiser ou non Hyal-1 dans les lysosomes. Nous avons montré que le traitement des cellules par la progestérone permet d'obtenir cet allègement.

	Témoin	12h progestérone	24h progestérone	48h progestérone
Hyaluronidase-1	1,19	1,18	1,18	1,17
β -galactosidase (Lysosomes)	1,19	1,16	1,10	1,08

Tableau 4: Distribution des densités d'équilibre (g/ml) de hyal-1 et des lysosomes après centrifugation isopycnique en gradient de saccharose (1,09-1,26) des fractions post nucléaires sédimentables (MLP).

On constate que dès 24h d'action de la progestérone, les distributions d'Hyal-1 et de la β -galactosidase se distinguent très nettement. On observe également sous l'effet de la progestérone un léger allègement des structures abritant Hyal-1.

L'allègement des lysosomes produit par la progestérone permet de distinguer sans ambiguïté les lysosomes des autres compartiments subcellulaires, comme par exemple les structures abritant Hyal-1. Dès 24h d'action de l'hormone, les distributions des structures abritant Hyal-1 et celles des lysosomes sont clairement distinctes, excluant totalement la localisation d'Hyal-1 dans les lysosomes.

L'ensemble de ces résultats est donc en accord avec ceux obtenus sur le foie de rat et le foie de souris. L'utilisation de la progestérone représente donc un outil adéquat pour modifier sélectivement la densité des lysosomes des cellules HepG2.

IV) Conclusions et perspectives

L'hyaluronan est un polymère qui se compose d'une répétition de disaccharides (N-acétyl-D-glucosamine et acide D-glucuronique).

Des hyaluronan-synthases (HAS1, HAS2 et HAS3) assurent sa production, alors que des hydrolases (les hyaluronidases **Hyal-1**, Hyal-2, Hyal-3 et PH-20 chez l'homme) le catabolisent.

L'hyaluronidase **Hyal-1** est souvent considérée dans la littérature comme une enzyme lysosomale. L'optimum de son pH est acide (Stern et Csoka, 2000 ; Stern, 2003), et la déficience en **Hyal-1** provoque une maladie de surcharge lysosomale : la mucopolysaccharidose IX (Triggs-Raine et al, 1999).

Il a été proposé que l'hyaluronan serait d'abord dégradé au niveau d'un repli de la membrane plasmique par l'enzyme Hyal-2. Il en résulterait des produits d'environ 20kDa qui rejoindraient alors les lysosomes où **Hyal-1** hydrolyserait les oligosaccharides de 20kDa en petites unités de 3 à 4 kDa. Enfin, ces derniers fragments seraient hydrolysés par d'autres enzymes lysosomales, β -exo-glucuronidase et N-acétylglucosaminidase (Stern, 2004).

Néanmoins, la localisation d'**Hyal-1** dans les lysosomes peut être mise en doute. Des patients atteints de I-cell disease manifestent une augmentation, dans le plasma, du taux d'enzymes lysosomales (Stern, 2004). Ce n'est pas le cas pour **Hyal-1**. Enfin, on ignore encore comment concilier le fait qu'**Hyal-1** ait un optimum d'activité à un pH acide et qu'elle se trouve dans le plasma où le pH est neutre.

Des recherches menées au laboratoire sur le foie de rat et le foie de souris permettent d'exclure une localisation d'**Hyal-1** dans les lysosomes. Cependant **Hyal-1** est présente en abondance dans le sang, il n'est donc pas possible d'éviter totalement la contamination de l'organe par du sang résiduel, ce qui peut créer des situations artéfactuelles. C'est pourquoi nous avons envisagé d'étudier cette répartition dans un système cellulaire exempt de toute contamination sanguine. Nous avons choisi les cellules d'hépatocarcinome humain HepG2, puisqu'il est décrit que ces cellules sont les plus riches en ARNm d'**Hyal-1** (Genomics Institute of the Novartis Research Foundation, 2004). Par ailleurs, nous avons vérifié que le sérum de veau fœtal utilisé pour la culture de ces cellules ne présente aucun signal **Hyal-1** repérable avec notre anticorps après immunoblotting.

La localisation précise d'un composant dans les lysosomes exige généralement la production d'un allègement de la densité de ces organites par l'injection dans l'animal de Triton WR-1339. Celui-ci provoque un gonflement et une diminution de la densité des lysosomes. Malheureusement, l'utilisation de ce détergent dans les cultures cellulaires est généralement toxique. C'est en particulier le cas des cellules HepG2. Nous avons donc mis au point une autre technique d'allègement des lysosomes, celle produite par la culture en présence de progestérone. Cette hormone, en effet, est capable de maintenir le cholestérol

libre dans les lysosomes en empêchant l'action de la protéine NPC1 qui en assure normalement le transport, engendrant ainsi un gonflement et une surcharge de ces organites. Ce type de surcharge est observé dans les cellules des patients atteints de la maladie Niemann-Pick type C, les cellules humaines déficientes en NPC1, les neurones des souris NPC1-/- et chez les souris BALB/c de souche NCTR.

Nos observations morphologiques ainsi que nos analyses biochimiques permettent de conclure que dans nos conditions expérimentales, les lysosomes des cellules HepG2 sont effectivement surchargés en lipides et voient leur densité d'équilibre considérablement diminuée. À l'aide de cet outil, nous avons pu exclure sans ambiguïté la localisation d'**Hyal-1** dans les lysosomes. En effet, après action de la progestérone, les profils de distribution d'**Hyal-1** après centrifugation isopycnique en gradient de saccharose (1,09-1,26) d'une fraction post nucléaire sédimentable sont clairement différents de ceux des enzymes lysosomales.

Dans le cadre de la poursuite de ce travail, plusieurs pistes nous sont offertes :

- En ce qui concerne les effets de la progestérone ; nous pourrions envisager :
 - d'utiliser, dans d'autres études de localisation d'un composant dans les lysosomes, l'allègement sélectif que nous avons mis en évidence.
 - de mettre au point une technique de purification des lysosomes des cellules HepG2 en mettant à profit la modification de densité de ces organites. Ce type de préparation pourrait être adéquat pour une étude protéomique où il s'agirait de valider ou non une localisation lysosomale.
 - d'examiner si d'autres types cellulaires subissent avec la même efficacité un allègement de leurs lysosomes dans l'espoir de pouvoir généraliser la technique.
- En ce qui concerne la localisation subcellulaire d'**Hyal-1** :
 - il serait intéressant de pouvoir préciser le type de vésicules abritant **Hyal-1**. Dans cette optique, nous pourrions transfecter des cellules avec l'ADN d'**Hyal-1** couplé à la GFP et mettre en évidence en microscopie confocale une éventuelle colocalisation de la GFP avec des marqueurs d'organites subcellulaires connus.

v) Bibliographie

Aebi, H. –“Catalase in vitro”, “Methods in Enzymology”, **105** (1984).

Amar-Costesec, A., Wibó, M., Thines-Sempoux, D., Beaufay, H. and Berthet, J.- “Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver IV. Biochemical, Physical, and Morphological Modifications of Microsomal Components Induced by Digitonin, EDTA, and Pyrophosphate”,
The Journal of cell biology, **62**, 717-745 (1974).

Frolov, A., Zielinski, S.E., Crowley, J.R., Dudley-Rucker, N., Schaffer, J.E. and Ory, D.S.- “NPC1 and NPC2 Regulate Cellular Cholesterol Homeostasis through Generation of Low Density Lipoprotein Cholesterol-derived Oxysterols.”,
J.Biol.Chem., **278** (28), 25517-25525 (2003).

Aronson, N.N. Jr and Davidson, E.A.- “Lysosomal Hyaluronidase”,
Preliminary Communications, **240** (7), 3222 (1965).

Aronson, N.N. Jr and Davidson, E.A.- “Lysosomal Hyaluronidase from rat liver”,
J.Biol. Chem., **242** (3), 437 (1967).

Aronson, N.N. Jr and De Duve, C.- “ Digestive Activity of Lysosomes. II. The digestion of macromolecules carbohydrates by extracts of rat liver Lysosomes”,
J.Biol.Chem., **213** (17), 4564 (1968).

Formby, B. and Stern, R. - “Lactate - Sensitive responses elements in genes involved in hyaluronan catabolisme”,
Biochemical and Biophysical Research Communications, **305** (1), 203-208 (2003).

Bhuvaneshwaran,C. and Morris, MD.-“Lysosome Lipid Storage Disorder in NCTR-BALB/c Mice:Spleen an lung lysosomes store unesterified cholesterol but differ in their phospholipid composition”, *Molecular and cellular biochemistry*, **214** (1-2), 15-22 (2000).

Blanchette-Mackie,E. J., Dwyer, N.K., Amende, L.M., Kruth, H.S., Butler, J.D., Sokol, J., Comly, M.E., Vanier, M.T., August, J. T., O. Brady, R., and Pentchev, P.G., " Type-C Niemann-Pick Disease: Low Density Lipoprotein Uptake is Associated with Premature Cholesterol Accumulation in the Golgi Complex and Excessive Cholesterol Storage in Lysosomes",
Proc Natl Acad Sci U S A., **85** (21), 8022-61 (1988).

Bollet, A.J., Bonner, W.M. and Nance, J.L.-“The presence of hyaluronidase in various mammalian tissues”, *J.Biol.Chem.*, **238** (11), 3522-3527 (1963).

Bourguignon, L.Y., Singleton, P.A., Diedrich, F., Stern, R., Gilad, E.-“ CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion”,
J. Biol. Chem.,**279** (26), 26991-27007 (2004).

Bowers, W.E., Finkenstaedt, J.T. and De Duve, C.- “Lysosomes in lymphoid tissue. I. The measurement of activities in whole homogenates”, *J. Cell.Biol.*, **32**, 325 (1967).

Brasaemle, D.L., Attie, A.D., *J. Lipid Res.*, **31**, 103-112 (1990).

Butler J.D. et al.,-“Progesterone Blocks Cholesterol Translocation from lysosomes”, *J. Biol. Chem.*, **267 (38)** 23797-23806 (1992).

Carstea, E.D., Morris, J.A., Coleman, K.G., Loftus, S.K., Zhang, D., Cummings, C. et al- “Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis”, *Science*, **277**, 228-231, (1997).

Cerneus, D.P., Ueffing, E., Posthuma, G. Strousz, G.J. and van der Endeg, A.- “Detergent Insolubility of Alkaline Phosphatase during Biosynthetic Transport and Endocytosis”, *The Journal of Biological Chemistry*, **268 (5)**, 3150-3155 (1993).

Chang, T-Y, Reid, P.C., Sugii, S., Ohgami, N., Cruz, J.C., and Chang, C. C. Y. - "Niemann-Pick Type C Disease and Intracellular Cholesterol Trafficking", *J. Biol. Chem.*, **280 (22)**, 20917-20920 (2005).

Cruz, C.- "Role of Niemann-Pick Type C1 Protein in Intracellular Trafficking of Low Density Lipoprotein-derived Cholesterol", *J.Biol. Chem.*, **275 (6)** 4013-4021, (2000)

Colorwick, S.P., Kaplan, N.O.-“Methods in Enzymology I”, *Academic Press N.Y. London*, **735** (1965).

Csoka, A.B., Frost, G.I., and Stern, R.-“The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes”, *Matrix Biology*, **20**, 499-508 (2001).

Culty, M., Nguyen, H.A., and Underhill, C.B.-“The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan”, *J. Cell Bio.*, **116**, 1055-1062 (1992).

DeAngelis, P.L.-“Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebra, bacterial pathogens and algal viruses”, *Cell. Mol. Life Sci.*, **56**, 670-682 (1999).

De Duve, C., Pressmann, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F.-“ Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue”, *J. Bioch. Chem.*, **60**, 604-617 (1955).

De Salegui, M., Pigman, W.-“ The existence of an acid-active hyaluronidase in serum”, *Arch. Biochem. Biophys.* **120**, 60-67 (1967).

Dirks, C., Duh, F.-M., Rai, S.k., Lerman, M.I., Miller, A.D.-“Mechanism of cell entry and transformation by enzootic nasal tumor virus”, *J.Virol.*, **76**, 2141-2149 (2002).

Ekici, S., Cerwinka, W.H., Duncan, R., Gomez, P., Civantos, F., Soloway, M.S and Lokeshwar, V.B.-“Comparison of the prognostic of hyaluronic acid, hyaluronidase (HYAL-1), CD44v6 and microvessl density for prostate cancer”, *Int. J. Cancer*, **112 (1)**,121-129 (2004).

Ekyune, K., Daichi, B., Masanori, k., Yamashita, M., Kashiwabara, S-I., and Baba, T. - "Identification of a hyaluronidase, Hyal-5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass", *PNAS*, **102** (50), 18028-18033 (2005).

Evanko, S.P., and Wight, T.N.-"Intracellular localisation of hyaluronan in proliferating cells", *J. Histochem. Cytochem.*, **47**, 1331-1342 (1999).

Evanko, S.P., Angello, J.C., and Wight, T.N.-"Formation of hyaluronan-and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. Arterioscler. Thromb", *Vasc. Biol.*, **19**, 1004-1013 (1999).

Forteza, R.M., Conner, G.E. and Salathe, M.-"Hyaluronan and airway mucosal host defense.", *Glycoforum*, Dec.16 (2002).

WWW.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA25E.html

Franzmann, E.J., Schroeder, G.L., Goodwin, W.J., Weed, D.T., Fischer, P. and Lokeshwar, V.B., -"Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors", *Int.J.Cancer*, **109** (5), 793-794 (2004).

Frolov, A., Zielinski, SE., Crowley, JR., Dudley-Rucker, N., Schaffer, JE., Ory, DS.- "NPC1 and NPC2 regulate cellular cholesterol homeostasis through generation of low density lipoprotein cholesterol-derived oxysterols", *J Biol Chem.*, **278** (28), 25517-25 (2003).

Frost, G.I., Csoka, A.B. and Stern, R.-"The hyaluronidases: A chemical, biological and clinical overview"-*Trends Glycosci.Glycotechnol.*, **8**, 419-434 (1996).

Frost, G.I., Csoka, T.B., Wong, T., Stern, R.-"Purification, cloning and expression of plasma human hyaluronidase.", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**, 10-15 (1997).

Frost, G.I., Mohapatra, G., Wong, T.M., Csoka, A.B., Gray, J.W., Stern, R.-"Hyal-1 LUCA-1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p21.3, is inactivated in head and neck squamous cell carcinomas by aberrant splicing of pre-mRNA", *Oncogene*, **19**, 870-877 (2000).

Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S., Lazarow, P.B.-"Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum", *J. Cell. Biol.*, **93** (1), 97-102 (1982).

Garver, W S. and al.,-"Localisation of the murine Niemann-Pick C1 protein to two distinct intracellular compartments", *J. Lipid Res.*, **41** (5), 673-687 (2000).

Gatphayak, k.-"Molecular characterization of the porcine hyaluronidases gene cluster on SSC 13q21", *Dissertation Zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Agrarwissenschaften des GeorAugust-Universität Göttingen*, Dezember (2003).

<http://Webdoc.sub.gwdg.de/diss/2004/gatphayak/gatphayak.pdf>

Ginetzinsky, A.G.-" Role of hyaluronidases in the re-absorption of water in renal tubules: the mechanism of action of antidiurectic hormone", *Nature*, **1**, 1218 (1958).

- Göransson, V.-“Hyaluronan and renal fluid handling”, *Acta Universitatis Upsaliensis Uppsal*, (2001).
- Hascall, V.C.-“Hyaluronan structure and physical properties”, *Glycoforum*, Dec.15 (1997).
- Hayashi, H., Shitara, M., Yamasaki, F -"The origin of lipid accumulated in liver lysosomes after administration of triton WR-1339", *J Biochem (Tokyo)*, **92(5)**, 1585-90 (1982).
- Heldin, P.-“Importance of hyaluronan biosynthesis and degradation in cell differentiation and tumor formation”, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **36 (8)**, 967-973 (2003).
- Henry, C.B., and Duling, B.R.-“Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan”, *Am. J. Physiol.*, **277**, H508-H514 (1999).
- Higgins, ME., Davies, JP., Chen, FW., Loannou, YA.-“Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network”, *Molec Genet Metab*, **68**, 1-13 (1999).
- Hua, Q., Knudson, C.B., and Knudson, W.-“Internalization of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor-mediated endocytosis”, *J. Cell Sci.*, **106**, 365-375 (1993).
- Hutterer, F.-“Degradation of mucopolysaccharides by hepatic lysosomes”, *Biochim.Biophys.Acta*, **115**, 312 (1966).
- Jachson, D.G.-“The lymphatic endothelial hyaluronan receptor LYVE-1”, *Glycoforum*, Apr.15 (2004).
- Jacobson, A., Rahmanian, M., Rubin, K., and Heldin, P.-“Expression of hyaluronan synthase 2 or hyaluronidase 1 differentially affects the growth rate of transplantable colon carcinoma cell tumors”, *International Journal of cancer*, **102**, 212-219 (2002).
- Jadot, M., Colmant, C., Wattiaux-De Conink, S.and Wattiaux, R.-“Intralysosomal hydrolysis of glycyl-L-phénylalanine-2-naphtylamide”, *Biochem. J.*, **219**, 965 (1984).
- Jedrzejask, M.J.-“Three dimensional structures of hyaluronidases lyases from Streptococcus species and their mechanism of hyaluronan degradation”, *Glycoforum*, (2002).
- Strauss, J.F. and al.-“Sterols and intracellular vesicular trafficking: lessons from the study of NPC1”, *Steroids*, **67**, 947-951, (2002).
- Johnson, W.J., Chacko, G.K., Philips, M.C., Rothblat, G.H., *J. Biol. Chem.* **265**, 5546-5553, (1990).
- Junker, N., Latini, S., Petersen, L.N., Kristjansen, P.E.-“Expression and regulation patterns of hyaluronidases in small cell lung cancer and glioma lines.”, *Oncol Rep.*,**10 (3)**, 609-616 (2003).

- Kaya, G., Rodriguez, I., Jorcano, J.L., Vassalli, P., and Stamenkovic, I.-“Selective suppression of CD44 in keratinocytes of mice bearing an antisense CD44 transgene driven by a tissue-specific promoter disrupts hyaluronate metabolism in the skin and impairs keratinocyte proliferation”, *Genes Dev.*, **11**, 996-1007 (1997).
- Knudson, W. and Knudson, C.B.-“The Hyaluronan Receptor, CD44”, *Glycoforum*, Mar.15, (1999).
- Ko DC., Gordon, MD., Yin, JY., Scott, MP.- “Dynamic movements of organelles containing Niemann-Pick C1 protein: NPC1 involvement in late endocytic events”, *Mol Biol Cell*, **12**, 601-614, (2001).
- Laurent, T.C., Fraser, J.R.-“Hyaluronan”, *FASEB J.* **6 (7)**, 2397-2404 (1992).
- Lepperdinger, G., Strobl, B. and Kreil, G.-“Hyal-2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidases with a novel type of specificity”, *J. Biol. Chem.* **273 (35)**, 22466-22470 (1998).
- Lepperdinger, G., Müllegger, J. and Kreil, G.-“Hyal-2, less active, but more versatile?”, *Matrix Biology*, **20**, 509-514 (2001).
- Lerman, M.I. and Minna, J.D.-“The 630 kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3 identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes”, *Cancer Res.*, **60**, 6116-6133 (2000).
- Liscum, L., Natalie, J. Munn,-“Intracellular cholesterol transport”, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1438**, 19-37 (1999).
- Liscum, L.-“Niemman-Pick Type C Mutations Cause Lipid Traffic Jam”, *Munksgaard International Publishers*, **1**, 218-225 (2000).
- Liu, Y., Wu, Y-P., Wada, R., Neufeld, E.B., Mullin, K.A., Howard, A.C., Pentchev, PG., Vanier, MT., Suzuki K. and Proia, R.L. -“Alleviation of neuronal ganglioside storage does not improve the clinical course of the Niemann–Pick C disease mouse”, *Human Molecular Genetics*, **9 (7)** 1087-1092 (2000)
- Lokeshwar, V.B., Schroder G.L., Carey R.I., Soloway M.S. and Lida N.-“Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing”, *J.Biol. Chem.*, **277**, 33654-33663 (2002).
- Lokeshwar, VB ., Cerwinka, WH., Isoyama, T., Lokeshwar, BL.- "HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer: a tumor promoter and suppressor", *Cancer Res.*, **65(17)**, 7782-9 (2005).
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.-“protein measurement with the Folin phenol reagent”, *J Biol. Chem.*, **193 (1)**, 265-75 (1951).
- Maxfield, R. F. and Wüstner, D.-“Intracellular cholesterol Transport”, *J. Clin. Invest.*, **110 (7)**, 891-898 (2002).

McGary, C.T., Raja, R.H. and Weigel, P.H.-“Endocytosis of hyaluronic acid by rat liver endothelial cells. Evidence for receptor recycling”, *Biochem.J.* **257**, 875-884 (1989).

McIntosh, A.L., Gallegos, A.M., Atshaves, B.P., Storey, S.M., Kannoju, D. and Schroeder, F.-“Fluorescence and multiphoton imaging resolve unique structural forms of sterol in membranes of living cells”, *J.Biol. Chem.* **278** (8), 6384-6403 (2003).

Millat, G., Marcais, C., Rafi, M.A., Yamamoto, T., Morris, J.A., Pentchev, P.G. et al.-“Niemann-Pick C1 disease : the I1061T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype”, *Am J Hum Genet*, **65**, 1321-1329 (1999).

Millat, G., Marcais, C., Tomasetto, C., Chikh, K., Fensom, A. H., Harzer, K. et al.-“Niemann-Pick disease : correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cystein-rich luminal loop”, *Am J Hum Genet*, **68**, 1373-1385 (2001).

Morris, J.A., Zhang, D., Coleman, K.G., Nagle, J., Pentchev, P.G. and Carstea, E.D.-“The genomic organization and polymorphism analysis of the human Niemann-Pick C1 gene”, *Biochem Biophys Res Commun*, **261**, 493-498 (1999).

Morris, MD. and al.-“Lysosome Lipid Storage Disorder in NCTR-BALB/c Mice”, *The American journal of pathology*, **108** (2), 140-149 (1982).

Naureckiene, S., Sleat, D.E., Lackland, H., Fenson, A., Vanier, M.T., Wattiaux, R. et al.-“Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick disease”, *Science*, **290**, 2298-2301 (2000).

Neudecker, B.A., Stern, R. and Connolly, M.K.- Clinical and laboratory investigations. Aberrant serum hyaluronan and hyaluronidases levels in scleroderma”, *British Journal of Dermatology*, **150** (3), 469 (2004).

Novak, U., Styly, S.S., Kaye, A.H., Lepperdinger, G.-“Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cell”, *Cancer Res.*, **59**, 6246-6250 (1999).

Ohgami, N.-"Binding between the Niemann–Pick C1 protein and a photoactivatable cholesterol analog requires a functional sterol-sensing domain", *PNAS*, **101** (34) 12473-12478 (2004)

Patel, SC. and al.-“Localization of Niemann-Pick C1 protein in astrocytes. Implications for neuronal degenerations in Niemann-Pick type C disease”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** (4), 1657-1662 (1999).

Pentchev, P.G., et al., - "Group C Niemann-Pick disease: faulty regulation of low-density lipoprotein uptake and cholesterol storage in cultured fibroblasts", *The FASEB Journal*, **1**, 40-45 (1987).

Pentchev, P.G., Brady, R.O., Blanchette-Mackie, E.J., Vanier, M.T., Wenger, D.A. et al.- "Type C Niemann-Pick disease : a parallel loss of regulatory responses in both the uptake and esterification of low-density lipoprotein-derived cholesterol in cultured fibroblasts", *J Biol Chem*, **261**, 16775-16780 (1991).

Pentchev, P.G, et al.- "Niemann-Pick C1 disease gene: Homology to mediators of cholesterol homeostasis", *Elsevier Science*, **277**, 228-231 (1997).

Pentchev P.G et al.- "Niemann-Pick Type C Disease and Intracellular Cholesterol Trafficking", *J. Biol. Chem.*, **280 (22)** 20917-20920 (2005).

Peters, T.J., Müller, M. and De Duve, C.- "Lysosomes of the arterial wall", *J. Exp. Med.*, **136**, 1117 (1972).

Sato, M. and al.- "Accumulation of cholesterol and GM2 ganglioside in cells cultured in the presence of progesterone: an implication for the basic defect in Niemann-Pick disease type C", *Brain Dev.*, **20 (1)** , 50-52 (1998).

Schoer, J.K., Gallegos, A.M., McIntosh, A.L., Starodub, O., Kier, A.B., Billheimer, J.T. and Schroeder, F.- "Lysosomal membrane cholesterol dynamics", *Biochemistry*, **39 (26)**, 7662-7677 (2000).

Scott, J.E.- "Secondary structure in hyaluronan solutions : chemical and biological implications. The biology of Hyaluronan", *Ciba Foundation Symposium No.143*:6-14 (1989).

Scott, J.E and Heatley, F.- "Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: A 13C NMR study", *Proc. Natl. Acad. USA*, **96**, 4850-4855 (1999).

Shuttleworth, T.L., Wilson, M.D., Wicklow, B.A., Wilkins, J.A. and Trigs-Raine, B.L., "Characterization of the Murine Hyaluronidase Gene Region Reveals Complex Organization and Cotranscription of Hya-1 with Downstream Genes, Fus-2 and Hya-3", *J. Biol. Chem.* **277**, 23008 (2002).

Spicer, A.P. and McDonand, J.A.- "Eucaryotic Hyaluronan synthases", *Glycoforum*, Sep.**15** (1998).

Steinberg, S.J., Ward, C.P., Fensom, A.H.- "Complementation studies in Niemann-Pick disease type C indicate the existence of a second group", *J Med Genet*, **31**, 317-320 (1994).

Stern, R.- "The breast tumor suppressor function of hyaluronidases", *Tumor Biology. California Breast cancer research program* (1995).

Stern, R.- "Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet ?", *Glycobiology*, **13 (12)**, 105R-115R (2003).

Stern, R.- "Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway", *Eur.J.Cell Biol.* **83**, 317-325 (2004).

Stern, R and Csoka, A.B.-“Mammalian Hyaluronidases”, *Glycoforum*, June, 23 (2000).

Stern, R and Csoka, A.B.-“Mammalian Hyaluronidases”, *Glycoforum*, Mai 18 (2004).

Strauss, J.F, Pei Liu, Lane K. Christenson, Hidemichi Watari-“Sterols and intracellular vesicular trafficking : lessons from the study of NPC1”, *Elsevier*, **67**, 947-951 (2002).

Sun, X., Marks, D.L., Park, W.D., Wheatley, C.L., Puri, V., O'Brien, J.F. et al.-“Niemann-Pick C variant detection by altered sphingolipid trafficking and correlation with mutations within a specific domain of NPC1”, *Am J Hum Genet*, **68**, 1361-1372 (2001).

Tammi, R., Rilla, K., Pienimäki, J-P., MacCallum, D.K., Hogg, M., Luukkonen, M., Hascall, V.C., and Tammi, M.-“Hyaluronan Enters Keratinocytes by a Novel Endocytic Route for Catabolism”, *J Biol Chem.*, **276 (37)**, 35111-35122 (2001)

Toole, B.P.-“Hyaluronan in Morphogenesis and Tissue Remodeling”, *Glycoforum*, Dec.15 (1998).

Toole B.P.-“Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue”, *Nature Reviews/Cancer*, **4**, 528-537 (2004).

Triggs-Raine, B.S., Salo, T.J., Zhang, H. Wicklow, B.A., Natowicz, M.R.-“Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidose IX”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6296-6300 (1999).

Turley, E. and Harrison, R.-“RHAMM, a member of hyalalderins”, *Glycoforum*, Jul.25 (1999).

Vaes, G.-“Hyaluronidase Activity in Lysosomes of Bone Tissue”, *Biochem J.*, **103**, 802 (1967).

Vanier, M. T., Rodriguez-Lafrasse, C., Rousson, R., Gazzah, N. Juge, M.-C., Pentchev, P.G. et al.-“ Type C Niemann-Pick disease : spectrum of phenotype variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing”, *Biochim Biophys Acta*, **1096**, 328-337 (1991).

Watari, H. and al.,-“Determinants of NPC1 expression and action: Key promoter regions, posttranscriptional control and the importance of "cystein-rich" loop”, *Exp. Cell Res.*, **259 (1)**, 247-256 (2000).

Wattiaux, R., Wattiaux-de Coninck, S- "Influence of the injection of "Triton WR-1339" on lysosomes of a rat transplantable hepatoma", *Nature.*, **216(120)**, 1132-3 (1967).

Weigel, P.H.-“Bacterial hyaluronan synthases” *Glycoforum*, Aug.15 (1998).

Weigel, P.H.-“Bacterial hyaluronan synthases-an update”, *Glycoforum*, April 15 (2004).

Weigel, P.H.-“Current progress and limitations in understanding of the molecular and cellular functions of hyaluronan synthases, Matrix Biology Institute (2004b)
<http://www.matrixbiologyinstitute.org/ha03/ch2/Weigel,%20Chap.%202,%20%20CURRENT%20PROGRESS%20AND%20LIMITS.pdf>

Wiegand, V. and al.,-“Transport of plasma membrane derived cholesterol and the function of Niemann-Pick C1 Proteins”, *FASEB J.* , **17** (6), 782-784 (2003).

Wight, T.N.-“Hyaluronan in Atherosclerosis and restenosis”,
Glycoforum, Feb.15 (1999).

Willenborg, M. et al.,-“Mannose 6-phosphate receptors, Niemann-Pick C2 protein, and lysosomal cholesterol accumulation”, *J Lipid Res.*, **46** (12), 2559-2569 (2005).

Yip, V.L.Y. and Withers, S.G.,-“Nature’s many mechanisms for the degradation of oligosaccharides”, *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 2707-2713 (2004).

Zhao H. et al.,-“Pharmacological sequestration of intracellular cholesterol in late endosomes disrupts ruffled border formation in osteoclasts”,
J Bone Miner Res., **21** (3), 456-465 (2006).

Zhang, M., Dwyer, NK., Love, DC., et al.-“Cessation of rapid late endosomal tubulovesicular trafficking in Niemann-Pick type C1 disease”,
Proc Natl Acad Sci USA, **98**, 4466-4471 (2001).

